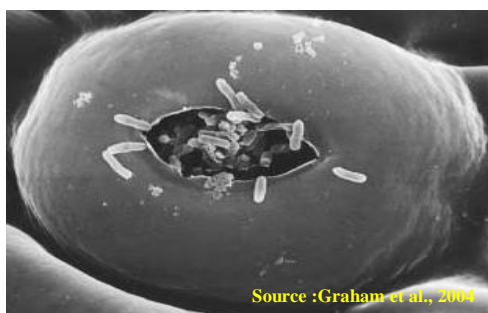

Mesure de la multiplication *in planta* de souches invasives de *Xanthomonas citri* pv. *citri*,
bactérie responsable du chancre asiatique des agrumes



Mémoire de stage de Master

Anaïs DAMOUR

Master 2 - Biodiversité et EcoSystèmes Tropicaux (BEST)

Université de La Réunion

Année universitaire 2013-2014

UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), CIRAD - Pôle de
Protection des Plantes (3P) / Université de La Réunion

Maîtres de stage :

Dr. Isabelle Robène-Soustrade
Chercheur - UMR PVBMT / CIRAD

Dr. Olivier Pruvost
Chercheur HDR - UMR PVBMT / CIRAD

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire sont le fruit de six mois de stage passés à l'UMR de PVBMT au CIRAD 3P, à Saint Pierre de La Réunion. Je tiens tout d'abord à remercier Bernard Reynaud, directeur de l'UMR, pour m'avoir accueillie au sein de sa structure.

Je remercie très sincèrement Olivier Pruvost et Isabelle Robène-Soustrade, mes encadrants de stage, pour m'avoir permis de réaliser ce stage et m'avoir accordé leur confiance. Je vous remercie pour toutes les connaissances que vous m'avez apportées, pour vos encouragements, vos conseils, vos discussions et corrections. Merci pour l'autonomie que vous avez su me laisser et la disponibilité dont vous avez fait preuve ; merci aussi d'avoir rendu ce stage agréable.

Je remercie également Claudine Boyer et Véronique Maillot qui ont bien voulu donner de leur temps pour me former aux techniques de microbiologie et de biologie moléculaire, et pour leur aide indispensable pendant les manipulations.

Un grand merci à Frédéric Chiroleu pour son aide précieuse, sa disponibilité et la patience dont il a fait preuve à mon égard au moment des analyses statistiques.

Merci à Lakshmi pour m'avoir permis de décompresser et me changer les idées au cours de « dîners gastronomiques » concoctés en rentrant chaque soir ; merci aussi à Morguen pour son énorme soutien moral, sa bonne humeur et sa joie de vivre ; sans vous, tout ceci n'aurait pu être réalisé, merci d'avoir été là pour moi.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour m'avoir soutenue, et je leur adresse mes plus profonds respects.

Liste des figures

Figure 1. A. Arbre couvrant de poids minimal (*Minimum spanning tree*) représentant le polymorphisme révélé par 31 minisatellites (MLVA-31) chez *Xcc*.

Figure 1. B. Arbre phylogénétique basé sur les SNPs représentant les différents pathotypes de *Xcc*.

Figure 2. Répartition mondiale du chancre asiatique des agrumes.

Figure 3. Symptômes caractéristiques du chancre asiatique causé par *Xcc*.

Figure 4. Principe de la PCR quantitative par les systèmes SybrGreen et Taqman.

Figure 5. Exemple de courbes d'amplification obtenues par qRTPCR ou qPCR en Taqman avec le logiciel StepOnePlus™.

Figure 6. Inoculations par infiltration sur feuilles du limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*).

Figure 7. Valeurs moyennes des Ct en fonction des amorces cibles après qRTPCR en SybrGreen de suspensions bactériennes, à une concentration de 10^5 CFU.mL⁻¹ de la souche IAPAR 306 de *Xcc*, non traitées et traitées à +80°C pendant 30 minutes.

Figure 8. Valeurs moyennes des Ct en fonction des amorces cibles après qRTPCR en SybrGreen de suspensions bactériennes, à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹ de la souche IAPAR 306 de *Xcc*, non traitées et traitées à +80°C pendant 30 minutes.

Figure 9. Valeurs moyennes des Ct en fonction des amorces cibles après qRTPCR en Taqman de suspensions bactériennes, à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹ de la souche IAPAR 306 de *Xcc*, non traitées et traitées à +80°C pendant trois heures.

Figure 10. Cinétiques de croissance bactérienne sur milieu minimum (XVM2) et milieu riche (LPG) pour les trois souches bactériennes de *Xcc*, IAPAR 306, JJ238.17 et JK4.1.

Figure 11. Quantification bactérienne par qPCR et qRTPCR chez la souche de référence IAPAR 306 de *Xcc*.

Figure 12. Cinétiques de croissance bactérienne sur milieu minimum (XVM2) déterminée par qRTPCR et par dénombrement sur milieu de culture pour les trois souches bactériennes de *Xcc*, IAPAR 306, JJ238.17 et JK4.1 avec les trois marqueurs MG-gumD1, XAC-3780 et XAC-3776.

Figure 13. Comparaison des concentrations bactériennes déterminées par qRTPCR et par dénombrement sur milieu de culture pour les trois souches bactériennes de *Xcc*, IAPAR 306, JJ238.17 et JK4.1 avec les marqueurs XAC-3776, XAC-3780 et MG-gumD1.

Figure 14. Cinétiques de croissance bactérienne sur milieu minimum (XVM2) déterminée par qPCR et par dénombrement sur milieu de culture pour les trois souches bactériennes de *Xcc*, IAPAR 306, JJ238.17 et JK4.1 avec les trois marqueurs MG-gumD1, XAC-3780 et XAC-3776.

Figure 15. Comparaison des concentrations bactériennes déterminées par qPCR et par dénombrement sur milieu de culture pour les trois souches bactériennes de *Xcc*, IAPAR 306, JJ238.17 et JK4.1 avec les marqueurs XAC-3776, XAC-3780 et MG-gumD1.

Figure 16. Cinétiques de croissance bactérienne *in planta* sur le limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*) déterminée par qPCR et par dénombrement sur milieu de culture pour la souche bactérienne de référence IAPAR 306 de *Xcc*, avec les marqueurs XAC-3776 et XAC-3780.

Figure 17. Comparaison des concentrations bactériennes *in planta* sur le limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*) déterminées par qPCR et par dénombrement sur milieu de culture pour la souche bactérienne de référence IAPAR 306 de *Xcc*, avec les marqueurs XAC-3776 et XAC-3780.

Liste des tableaux

Tableau 1. Séquence, fonction et taille de fragment attendu des amorces et sondes utilisées pour les amplifications par qPCR et qRTPCR des souches de *Xcc*.

Tableau 2. Récapitulatif des résultats de qRTPCR de suspensions bactériennes à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹ de la souche IAPAR 306 de *Xcc* traitées à +80°C pendant trois heures.

Liste des acronymes

3 P : Pôle de Protection des Pantes

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ANOVA : Analyse de variance (*ANalyse Of VAriance*)

BET : Bromure d’Ethidium

BIORISK : Génomique évolutive, épidémiologie moléculaire et diagnostic de bactéries peu polymorphes à dissémination aérienne

BLAST : Outil de recherche et d’alignement local basique (*Basic Local Alignment Search Tool*)

CAA : Chancre Asiatique des Agrumes

CFU : Unité Formant Colonie (*Colony Forming Unit*)

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

Ct : seuil de cycle (*Cycle threshold*)

DAPC : Analyse Discriminante en Composantes Principales (*Discriminant Analysis of Principal Components*)

DO : Densité Optique

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique (*Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid*)

EPS : Exopolysaccharides

HPLC : Chromatographie en phase liquide sous haute pression (*High Performance Liquid Chromatography*)

Hrp : gènes impliqués dans le pouvoir pathogène et la réaction hypersensible (*Hypersensitive Response and pathogenicity*)

KC-LPGA : Kasugamicine Cephalexine Levure Peptone Glucose Agar

LPG : Levure Peptone Glucose

LPGA : Levure Peptone Glucose Agar

LPS : Lipopolysaccharides

MLSA : Analyse de séquences multilocus (*MultiLocus Sequence Analysis*)

MLVA : Analyse multilocus du polymorphisme de séquences répétées en tandem (*Multi Locus VNTRs Analysis*)

NCBI : Centre Nationale d’Informations Biotechnologiques (*National Center for Biotechnology Information*)

NS2 : Niveau de Sécurité 2

PVBMT : Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

qPCR : Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

qRTPCR : Réaction en chaîne par polymérase de transcription inverse en temps réel (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

SNPs : Polymorphismes à un seul nucléotide (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

T3E : Effecteurs de type 3 (*Type 3 Effectors*)

T3SS : Système de sécrétion de type 3 (*Type 3 Secretion System*)

TAE : Tris Acétate EDTA

TAL : Effecteurs activateurs de transcription (*Transcription Activator Like*)

Tm : Température de fusion (*Temperature of melting*)

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : Ultra-violets

VNTRs : Séquences répétées en tandem (*Variable Number of Tandem Repeats*)

Xcc : *Xanthomonas citri* pv. *citri*

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	3
1. Emergence des maladies des plantes et dynamique évolutive des populations d'agents pathogènes	3
1.1. Emergence des maladies des plantes	3
1.2. Dynamique évolutive des populations d'agents pathogènes	4
2. Fitness bactérien	4
3. L'agent pathogène : <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> (Xcc)	5
3.1. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et génomiques	5
3.2. Classification	5
3.3. Gamme d'hôtes	6
3.4. Diversité génétique	6
3.5. Déterminants du pouvoir pathogène	7
4. Le chancre asiatique des agrumes (CAA)	9
4.1. Historique et distribution géographique	9
4.2. Symptomatologie	9
4.3. Modes de survie et de dissémination ; stratégies de lutte	9
5. Problématique et objectifs du stage	10
II. MATERIELS ET METHODES	12
1. Mise au point des outils de qPCR et de qRTPCR	12
1.1. Principe de la qPCR et de la qRTPCR	12
1.2. Choix du marqueur nucléotidique	12
1.2.1. Analyses <i>in silico</i> : recherche de marqueurs nucléotidiques	12
1.2.2. Aptitude des gènes candidats à refléter la viabilité des cellules bactériennes	13
1.3. Etapes de la mise au point de la qRTPCR	13
1.3.1. Souche bactérienne utilisée - Préparation de la souche et conditions de culture	13
1.3.2. Traitement d'inactivation - Viabilité et cultivabilité des cellules bactériennes	13
1.3.3. Extraction et purification de l'ARN	14
1.3.4. Amplifications de l'ARN par qRTPCR et RT-PCR	14
1.3.5. Détection des ARNm des différentes cibles	15
1.4. Amplification de l'ADN par qPCR	15
2. Application de la qPCR et de la qRTPCR <i>in vitro</i>	15
2.1. Caractérisation des paramètres de croissance bactérienne <i>in vitro</i>	15
2.2. Caractérisation des cinétiques de croissance bactérienne <i>in vitro</i>	16
2.2.1. Extraction de l'ARN et de l'ADN	16
2.2.2. Amplifications de l'ARN par qRTPCR et de l'ADN par qPCR	17
2.2.3. Quantification bactérienne par construction de courbes de gamme étalon	17
3. Application de la qPCR <i>in planta</i>	17
3.1. Matériel végétal utilisé et dispositif expérimental	17
3.2. Caractérisation des cinétiques de croissance bactérienne <i>in planta</i>	17
3.2.1. Souche bactérienne utilisée - Inoculation sur feuilles d'agrumes	17
3.2.2. Extraction de l'ADN	18
3.2.3. Amplifications de l'ADN par qPCR	18
3.2.4. Quantification bactérienne par construction de courbes de gamme étalon	18

4. Analyse des données	18
III. RESULTATS.....	19
1. Cultivabilité, viabilité et détection des ARNm après traitement à la chaleur : choix des marqueurs..	19
2. Mesure de la cinétique bactérienne <i>in vitro</i>	20
2.1. Cinétiques de la croissance bactérienne <i>in vitro</i> sur milieu riche (LPG) et minimum (XVM2) déterminées par dénombrement sur milieu de culture	20
2.2. Construction de courbes de gamme étalon en qPCR et qRT-PCR (quantification bactérienne)	21
2.3. Comparaison des concentrations bactériennes déterminées par qRT-PCR et par dénombrement sur milieu de culture	21
2.4. Comparaison des concentrations bactériennes déterminées par qPCR et par dénombrement sur milieu de culture	22
3. Mesure de la cinétique bactérienne <i>in planta</i>	23
3.1. Comparaison des concentrations bactériennes <i>in planta</i> déterminées par qPCR et par dénombrement sur milieu de culture	23
IV. DISCUSSION.....	23
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	27

I. INTRODUCTION

1. Emergence des maladies des plantes et dynamique évolutive des populations d'agents pathogènes

1.1. Emergence des maladies des plantes

L'un des objectifs principaux de l'épidémiologie moléculaire est de déterminer les mécanismes conduisant à l'émergence des maladies des plantes (Anderson et al., 2004). L'intensification de l'agriculture depuis le milieu du XX^{ème} siècle est l'un des mécanismes à l'origine de la fragilisation des systèmes de production. Cette fragilisation facilite l'émergence des maladies des plantes et se traduit par des changements majeurs. Ces changements se caractérisent par : (i) une homogénéisation des variétés cultivées, (ii) une perte de la diversité en espèces, (iii) une augmentation de la densité en hôtes sensibles aux micro-organismes phytopathogènes (Stuckenbrock and McDonald, 2008), et (iv) une intensification majeure des échanges (homme et végétaux) liée à la mondialisation (Hulme, 2009), facilitant alors l'introduction d'agents pathogènes dans une nouvelle zone géographique ou l'introduction de nouvelles souches d'agents pathogènes déjà présents. Les introductions constituent le facteur le plus important des émergences de maladies des plantes (Anderson et al., 2004).

Les maladies infectieuses émergentes sont définies comme étant causées par des agents pathogènes ayant : (i) augmenté en fréquence et en étendue géographique dues au changement climatique, (ii) changé d'agressivité ou de gamme d'hôtes, (iii) récemment évolué (e.g. acquisition de résistance à un pesticide), ou (iv) récemment été découverts ou reconnus (Anderson et al., 2004). De telles émergences de maladies, caractérisées par des expansions géographiques, s'apparentent aux invasions biologiques (Desprez-Loustau et al., 2007; Stuckenbrock and McDonald, 2008). Hulme (2009) a décrit les liens entre les principaux moteurs de la mondialisation et leurs influences sur les invasions biologiques. Ces moteurs façonnent ainsi l'origine, la fréquence et l'ampleur des mouvements des espèces par les voies d'introduction partout dans le monde. Ces voies d'introduction, qu'elles soient aquatiques ou terrestres, sont diverses et très complexes.

Dans le cas des bactéries phytopathogènes, une étude a souligné les migrations comme étant la force majeure conduisant aux émergences exacerbées par la mondialisation (Anderson et al., 2004). C'est par exemple le cas de *Ralstonia solanacearum*, bactérie responsable du flétrissement bactérien (Kelman, 1954) et à fort impact économique (Mansfield et al., 2012), qui est répandue sur les cinq continents et émergente dans les régions tempérées froides d'Europe et des Etats-Unis (Hayward, 1991; Denny, 2006). L'émergence d'une maladie peut également résulter de phénomènes d'adaptation. Ces phénomènes correspondent à l'ensemble des modifications d'un génotype ayant été sélectionnées par l'environnement dans lequel il vit, et lui permettant d'avoir une meilleure survie et reproduction par rapport aux autres organismes qui l'entourent (McDonald and Linde, 2002). Par exemple, *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum*, désormais émergente sur bananier dessert et plantain en Afrique, aurait évolué à partir de souches originaires du bananier d'Abyssinie (Tripathi et al., 2009; Wasukira et al., 2012).

1.2. Dynamique évolutive des populations d'agents pathogènes

L'épidémiologie des maladies des plantes permet de comprendre la dynamique de la maladie dans l'espace et dans le temps. La structure génétique des populations de pathogènes est définie comme le taux et la distribution de la diversité génétique au sein des populations. Elle est la résultante d'interactions entre cinq forces évolutives : (i) la sélection induite par l'hôte et l'environnement, (ii) la dérive génétique (liée à la taille de la population), (iii) les flux de gènes et de génotypes, (iv) le taux de mutation, et (v) le mode de reproduction (McDonald and Linde, 2002). L'analyse de ces forces évolutives permet de décrire et de comprendre la dynamique évolutive des agents pathogènes.

À l'échelle de la population, les cinq forces évolutives précédemment décrites permettent de déterminer le niveau d'apparition de la diversité. Une différence adaptative pourra alors survenir dans la population, résultant de l'apparition d'une mutation du génome d'un individu natif ou par l'immigration d'un nouvel individu. À l'échelle de l'individu, la diversité et la structure génétique des populations sont impactées par deux mécanismes : (i) l'apparition de mutations pouvant se répandre dans la population par transmission verticale, entraînant l'émergence d'une nouvelle lignée et de nouveaux variants¹ (Spratt and Maiden, 1999), et (ii) l'acquisition de matériel génétique exogène lié au transfert horizontal de gènes (THG) (Van Elsas et al., 2003). Trois mécanismes indépendants permettent à une bactérie d'acquérir ce matériel : (i) la conjugaison, correspondant à la transmission d'un plasmide d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse avec possibilité d'intégration dans le génome (Llosa et al., 2002) ; (ii) la transformation, qui est l'intégration d'un fragment d'ADN étranger libre dans une bactérie (Seitz and Blokesch, 2012) ; et (iii) la transduction, équivalente au transfert de matériel génétique par l'intermédiaire d'un bactériophage (Miller, 2001). Le THG impacte de façon significative l'évolution des génomes bactériens et leur adaptation aux nouveaux environnements (Eisen, 2000). Par exemple, *Ralstonia solanacearum* est potentiellement sujette à de fréquents THG (Nakamura et al., 2004) alors que les pathovars² au sein du genre *Xanthomonas* sont connus pour être peu recombinants (Vernière et al., 2014). Dans le cas de variants, il y a accroissement possible de la performance des bactéries dans leur environnement (Wiser et al., 2013). Les individus les moins sélectionnés et adaptés disparaîtront progressivement (Atwood et al., 1951; Levin, 1981) tandis que la fréquence du génome des individus les plus adaptés augmentera via une sélection positive (Achtman, 1997).

2. Fitness bactérien

Le fitness ou la valeur adaptative est la capacité d'un organisme à survivre et à se reproduire dans un environnement donné (Orr, 2009). Cependant, le fitness d'une bactérie est une caractéristique complexe qui englobe à la fois la capacité d'un génotype à se reproduire dans un hôte, à être transmis, et à résister aux défenses de l'hôte (Leach et al., 2001; Gordo et al., 2011). La spécialisation d'hôtes est une forme

¹ Variant : individu présentant un ou des caractères différents par rapport aux autres individus issus de la même population (<http://www.edu.upmc.fr/>).

² Pathovar : classification infrasubspécifique regroupant des populations bactériennes capables de causer des symptômes caractéristiques ou en fonction de leur spectre d'hôtes (Manners, 1993).

d'adaptation où l'agent pathogène est capable d'attaquer un seul hôte ou une gamme d'hôtes relativement restreinte. Elle s'accompagne souvent d'une spécialisation des déterminants du pouvoir pathogène. L'absence de déterminants généralistes, permettant d'attaquer une vaste gamme de plantes, favorise ainsi un meilleur fitness sur l'hôte (McDonald and Linde, 2002).

La mesure du fitness de souches bactériennes peut être une voie pour comprendre l'émergence de certaines souches responsables d'épidémies. Cette mesure peut s'effectuer par deux moyens différents mais complémentaires : le fitness compétitif et les essais de courbes de croissance. Dans le premier cas, l'expérience est réalisée avec la souche sauvage et la souche mutante qui sont toutes les deux en compétition dans un environnement donné. Une comparaison de la fréquence de chaque génotype est alors réalisée avant et après la compétition. Dans le second cas, la souche sauvage et la souche mutante croissent séparément pendant une période donnée, et la dynamique de croissance peut de cette façon être déterminée. Il est possible de mesurer le fitness d'un génotype donné (souche sauvage) en construisant des souches mutantes qui diffèrent de la souche sauvage par une seule mutation (Gordo et al., 2011).

3. L'agent pathogène : *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc)

3.1. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et génomiques

Xanthomonas citri pv. *citri* (Xcc) est une gamma-protéobactérie de l'ordre des *Xanthomonadales* et de la famille des *Xanthomonadaceae* (Saddler and Bradbury, 2005). Il s'agit d'un Gram négatif de type chimio-organotrophe³ aérobic. Xcc produit un pigment photo-protecteur appelé xanthomonadine à l'origine de la couleur jaune des colonies. Sa température optimale de croissance est comprise entre 28 et 30°C. Les bactéries du genre *Xanthomonas* produisent des exopolysaccharides (EPS) non structurés en capsule, appelés xanthanes, qui sont très utilisés dans l'industrie. Sur milieu de culture riche LPGA (*Levure Peptone Glucose Agar*), les colonies de Xcc sont rondes, brillantes, muqueuses et de couleur jaune (Vernière et al., 1991) (Annexe 1). Les génomes de Xcc sont organisés en plusieurs réplicons circulaires : un chromosome de 5,2 Mb (mégabases) et un ou plusieurs plasmides. Chez la souche de référence IAPAR 306, cohabitent deux plasmides de 34 et 65 kb (kilobases) (Pruvost et al., 1992; Da Silva et al., 2002), et seul le second est conjugatif⁴. Les plasmides conjugatifs sont apparentés au système de sécrétion de type 4, qui est impliqué dans l'échange d'ADN entre différentes espèces bactériennes (Zaharik et al., 2002).

3.2. Classification

La bactérie a fait l'objet de plusieurs reclassifications, tout comme un grand nombre d'autres pathovars de *Xanthomonas*. Initialement dénommée *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Dye, 1962; Dye et

³ Chimio-organotrophe : organisme qui puise son énergie de l'oxydation de composés organiques. Il utilise pour sa croissance des substrats carbonés organiques comme source de carbone (<http://www.edu.upmc.fr/>).

⁴ Plasmide conjugatif : plasmide codant pour les fonctions nécessaires à son transfert d'une cellule bactérienne à une autre (<http://chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.2.2.3.html>).

al., 1980), elle a été reclassifiée sur la base de données d'hybridations ADN:ADN en *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Vauterin et al., 1995). Rademaker et al. (2000) a mis en évidence que l'espèce *X. axonopodis sensu* Vauterin est une espèce complexe composée de six groupes génétiques (dénommés 9.1 à 9.6). Elle appartient au groupe 9.5 désormais élevé au rang d'espèce (Schaad et al., 2006; Ah-You et al., 2009), d'où la nomenclature actuelle : *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*).

3.3. Gamme d'hôtes

Le genre *Xanthomonas* possède globalement un très large spectre de plantes hôtes de 400 espèces différentes ; chaque souche montrant une spécificité d'hôte restreinte le plus souvent de un à quelques genres d'une même famille botanique (Swings and Civerolo, 1993). Chez les espèces du genre *Xanthomonas*, la gamme d'hôtes est souvent indiquée par le statut du pathovar (Young et al., 1992). Plus de 140 pathovars ont été définis pour ce genre (Bull et al., 2012). Lorsque des souches d'un même pathovar présentent une spécialisation d'hôte différentielle, elles sont alors classées en pathotypes⁵. *Xcc* est responsable du chancre asiatique des agrumes (CAA) (Schaad et al., 2006). Cette bactérie possède un spectre d'hôtes incluant plusieurs genres au sein de la famille des Rutacées (Stall and Seymour, 1983; Bradbury, 1986; Graham et al., 2004). Trois pathotypes ont été distingués au sein du pathovar *citri* : (i) le pathotype A pouvant infecter toutes les espèces commerciales d'agrumes et considéré comme le plus dangereux agronomiquement, et (ii) les pathotypes A* et A^w se différenciant du précédent par leur gamme d'hôtes très restreinte sur le limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*), le limettier de Tahiti (*Citrus latifolia*) et le porte-greffe *Citrus macrophylla* (Escalon et al., 2013). Le pathotype A^w se distingue du pathotype A* par son aptitude à provoquer une réaction hypersensible chez certaines espèces d'agrumes (oranger, pomelo, etc.) (Ryback et al., 2009). *Xcc* est un modèle biologique particulièrement intéressant de part sa spécificité d'hôte à l'échelle infraspécifique.

3.4. Diversité génétique

Depuis ces dernières années, un grand nombre d'outils de typage moléculaire ont été développés. Ces outils sont indispensables pour mieux appréhender l'épidémiologie des agents pathogènes. Ils permettent de différencier des souches génétiquement proches au sein d'une même espèce bactérienne ou d'un pathovar (Blanc, 2004; Bui Thi Ngoc et al., 2009a,b).

Le typage MLSA (*MultiLocus Sequence Analysis*) est une méthode ciblant les gènes de ménage⁶, et est généralement utilisée pour l'analyse des structures de populations bactériennes pathogènes. Toutefois, sa résolution pour les bactéries pathogènes monomorphes est trop faible puisque ces dernières contiennent une faible diversité de séquences (Maiden, 2006; Achtman, 2008). Comme un grand nombre de bactéries

⁵ Pathotype : groupe de variants pathogènes (Manners, 1993).

⁶ Gènes de ménage : gènes ubiquistes pour une population, caractérisés par une vitesse d'évolution modérée et codant pour des protéines essentielles impliquées dans le métabolisme primaire (Cooper and Feil, 2004).

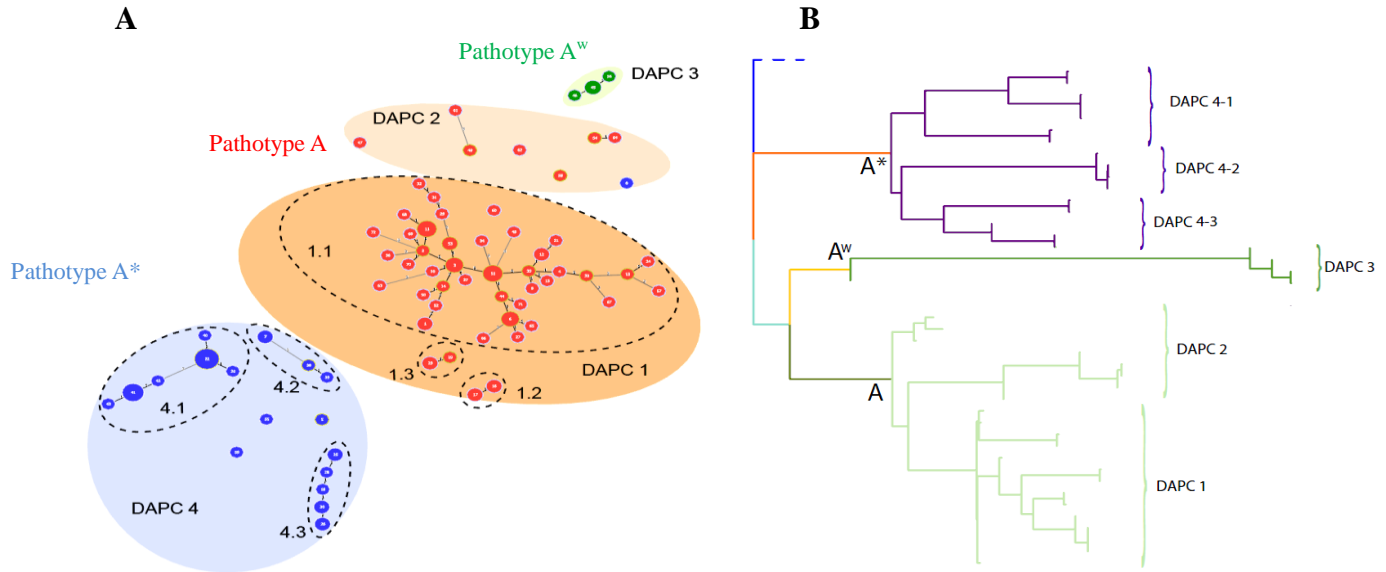


Figure 1. (A) Arbre couvrant de poids minimal (*Minimum spanning tree*) représentant le polymorphisme révélé par 31 minisatellites (MLVA-31) (D'après Pruvost et al., 2014) et (B) arbre phylogénétique basé sur les SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) montrant les différents pathotypes de *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc) regroupés chacun en une structure monophylétique (D'après Gordon et al., *in prep.*).

Les groupes génétiques DAPC 1+2, 3 et 4 (*Discriminant Analysis of Principal Components*) correspondent respectivement aux pathotypes A, A^w et A*. Certains de ces groupes (par exemple DAPC 4) sont eux mêmes subdivisés en sous-groupes (4.1, 4.2 et 4.3) lorsqu'ils forment des complexes clonaux.

pathogènes d'importance agricole, *Xcc* est une bactérie monomorphe (Kado, 2010). Par conséquent, la méthode MLSA ne permet pas de discriminer les variants A* et A^w de *Xcc* et est plutôt utilisée pour positionner la bactérie dans la phylogénie des *Xanthomonas* (Bui Thi Ngoc et al., 2010).

Les séquences d'ADN répétées en tandem, souvent appelées VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), constituent des zones hypervariables réparties dans les génomes (Pourcel and Vergnaud, 2011). Les VNTRs sont également dénommés microsatellites ou minisatellites en fonction de la taille des motifs répétés (taille comprise entre 1 et 6 pb (paires de bases) pour les microsatellites, et supérieure à 6 pb pour les minisatellites) (Ellegren, 2004). L'analyse multilocus du polymorphisme de séquences répétées en tandem (*Multi Locus VNTRs Analysis* ou MLVA) est bien adaptée aux bactéries monomorphes comme *Xcc*, tels que le montrent deux schémas MLVA ciblant des microsatellites (MLVA-14) (Bui Thi Ngoc et al., 2009a,b; Vernière et al., 2014) et minisatellites (MLVA-31) chez *Xcc* (Pruvost et al., 2014) (Figure 1A).

Plus récemment, une nouvelle méthode utilisant les SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) déduits de la séquence de génomes complets (Gordon et al., *in prep.*) a montré que les différents pathotypes de *Xcc* ont chacun une structure monophylétique (Figure 1B). Les pathotypes A et A* sont divisés en deux et trois sous-clades respectivement, en relation avec leur origine géographique. L'expansion géographique majeure des souches du pathotype A au cours du XX^{ème} siècle a très majoritairement concerné un seul de ces groupes, i.e. DAPC 1 (*Discriminant Analysis of Principal Components*).

3.5. Déterminants du pouvoir pathogène

La relation entre une plante et une bactérie met en jeu une interaction très étroite au niveau moléculaire. La virulence et l'agressivité sont les deux composantes de l'interaction plante-micro-organisme. La virulence correspond à la capacité d'un micro-organisme à coloniser ou non un hôte donné (valeur qualitative du pouvoir pathogène). L'agressivité est une notion quantitative traduisant la sévérité et l'intensité d'une maladie, conduisant ainsi à la cinétique d'apparition des symptômes provoqués et le degré de multiplication *in planta* (Jones and Dangl, 2006).

Les bactéries phytopathogènes sont dotées d'une grande variabilité de facteurs de virulence et d'agressivité. Parmi ces facteurs, il y a les effecteurs qui constituent l'ensemble des molécules secrétées par les organismes pathogènes (Büttner and He, 2009). De nombreuses bactéries à Gram négatif ont recours à un système de sécrétion de type 3 (T3SS : *Type 3 Secretion System*) afin de délivrer un ensemble de protéines dans la cellule de leur hôte (Ponciano et al., 2003). Le T3SS, et les effecteurs de type 3 (T3E : *Type 3 effectors*) (protéines effectrices) associés, sont indispensables pour la virulence de nombreuses bactéries phytopathogènes telles que les *Xanthomonas* spp. (Cornelis, 2006). Le T3SS est une seringue moléculaire constituée d'un corps basal se prolongeant par un pilus extracellulaire, le « pilus hrp », reliant la bactérie à la cellule-hôte (Tampakaki et al., 2004). Les régions flanquantes de certains gènes *hrp*⁷ codent

⁷ Gènes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) : gènes impliqués dans le pouvoir pathogène et la capacité d'induction de réactions de type HR sur plantes non hôtes ou résistantes ainsi que la maladie sur plantes hôtes sensibles (Lindgren, 1997).

pour des T3E (Noël et al., 2002). Les T3E partagent de nombreuses similarités avec les protéines végétales (Genin and Boucher, 2004). Ils interviennent directement dans la cellule hôte, et interfèrent avec les composants essentiels du système immunitaire de la plante dans le but de les supprimer ou de récupérer des nutriments. Ils interviennent à différents niveaux : interférence avec les réponses de défense spécifique, développement des symptômes, etc. (Boscariol et al., 2006; White et al., 2009). Les T3E sont collectivement indispensables à l'agressivité, mais considérés individuellement ils ne sont pas systématiquement essentiels au pouvoir pathogène (Galán, 2009). Cependant et pour la première fois, Rybak et al. (2009) ont mis en évidence le rôle d'un T3E à titre individuel, XopAG (AvrGf1), dans l'induction de réactions hypersensibles⁸ sur une plante non hôte de *Xcc*.

Les effecteurs TAL (*Transcription Activator Like*) sont quant à eux caractérisés par des propriétés structurales et fonctionnelles spécifiques leur permettant d'agir directement sur l'expression des gènes de l'hôte. Ils miment les facteurs de transcription eucaryotes pour activer des gènes de sensibilité (S) et/ou des gènes de résistance (R) (Boch and Bonas, 2010). Les génomes de *Xcc* contiennent deux à six effecteurs TAL dont un seul a un rôle majeur dans le pouvoir pathogène (PthA4). Hu et al. (2014) ont montré que PthA4 interagissait avec le promoteur de deux gènes eucaryotes, *csLOB1* et *csSWEET1* en activant leur transcription et en les surexprimant. Le gène *csLOB1* (*Lateral Organ Boundaries*) est un facteur de transcription provoquant les symptômes du CAA. Le gène *csSWEET1* (famille de gènes S) détourne les sucres au profit de la bactérie (White and Yang, 2009; Chen et al., 2010). Certains effecteurs TAL sont des facteurs de virulence essentiels pour l'infection, alors que d'autres contribuent au fitness *in planta* (Marois et al., 2002; Escalon, 2013). Ainsi, les effecteurs T3E et TAL interviennent à la fois dans les phénomènes d'avirulence (interaction incompatible) et/ou de pouvoir pathogène et d'agressivité (modulation de la réponse compatible) (Escalon, 2013).

Différentes structures sont impliquées dans l'interaction plante-pathogène. (i) L'adhésion est la capacité d'attachement d'une bactérie à son hôte grâce à des protéines de surface nommées adhésines. Ces protéines interviennent à différents stades de l'infection comme par exemple la migration ou la croissance *in planta* (Das et al., 2009; Gottig et al., 2009). (ii) Le chimiotactisme est l'attraction ou la répulsion des bactéries par un ensemble de substances nutritives (sucres, acides aminés, etc.). Chez *Xcc*, certains gènes du chimiotactisme semblent être régulés par le régulateur du T3SS *hrpG* (Guo et al., 2011). Mhedbi-Hajri et al. (2011) ont montré que les *Xanthomonas* spp. possédaient des répertoires uniques de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion, mais aussi dans la détection (« sensing »). (iii) Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de sucre sécrétés dans le milieu extracellulaire. Ils sont un composant essentiel des biofilms et favorisent l'adhésion du pathogène à la surface végétale (Rigano et al., 2007). (iv) Les lipopolysaccharides (LPS) sont quant à eux présents uniquement dans la paroi externe des bactéries à Gram négatif. Ils sont impliqués dans les phénomènes de perméabilité contre les composés

⁸ Réaction hypersensible (HR) : réaction spécifique d'une plante à l'attaque d'un pathogène (Ward, 1902).



Figure 2. Répartition mondiale du chancre asiatique des agrumes (CAA) représentée par les ronds oranges (D'après Bui Thi Ngoc et al., 2009a).



Figure 3. Symptômes caractéristiques du chancre asiatique causé par *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc). Les symptômes se présentent sous la forme de lésions nécrotiques d'aspect chancreux sur différents organes de la plante-hôte tels que la tige (A), la feuille (B) et le fruit (C). Les lésions sont peu profondes mais peuvent provoquer la défoliation, le dépérissement, la déformation et la chute précoce des fruits (Photos : C. Vernière, 2008).

toxiques sécrétés par la plante (Lu et al., 2008). Chez *Xcc*, les LPS sont impliqués dans la formation du biofilm, la virulence, la croissance *in planta*, etc. (Laia et al., 2009). (v) Le quorum sensing est le moyen par lequel les bactéries régulent l'expression de certains gènes en fonction de leur densité (Albuquerque et al., 2014). Il est impliqué dans les différents cycles de vie des bactéries (survie, pouvoir pathogène, etc.). Chez les *Xanthomonas*, le quorum sensing contrôle la production d'EPS et l'expression d'enzymes extracellulaires (Tan et al., 2014). Le fitness bactérien est ainsi une notion complexe englobant l'ensemble de ces composantes de l'interaction plante-pathogène.

4. Le chancre asiatique des agrumes (CAA)

4.1. Historique et distribution géographique

Bien que son origine précise demeure inconnue, *Xcc* est originaire d'Asie (Graham et al., 2004). L'aire d'origine de la bactérie coïncide avec l'origine géographique des agrumes située entre le Nord de l'Inde et le Sud-Est de l'Asie en fonction des espèces (Ollitrault and Navarro, 2012). Le CAA est répandu dans plus d'une trentaine de pays agrumicoles répartis sur de nombreuses régions, sauf l'Europe, l'Afrique du Nord, l'Australie, la Nouvelle Zélande et certains états des Etats-Unis qui sont épargnés par la maladie (Bui Thi Ngoc et al., 2009a) (Figure 2). La maladie se développe particulièrement dans les régions où la variation des précipitations suit celle des températures au cours de l'année, ce qui se traduit par des attaques plus sévères dans les régions chaudes et humides (Gottwald et al., 2002). Cette maladie est l'une des phytobactérioses majeures des cultures agrumicoles dans le monde (Graham et al., 2004). C'est pourquoi *Xcc* est listée comme organisme de quarantaine dans de nombreux pays agrumicoles où la maladie est absente ou a été éradiquée. Cette bactérie est aussi classée comme organisme à double usage dans l'Union Européenne en raison de son éventuelle utilisation comme arme biologique (Young et al., 2008).

4.2. Symptomatologie

Les symptômes les plus caractéristiques observés chez la plupart des plantes hôtes sont des lésions nécrotiques d'aspect chancreux, de forme circulaire résultant d'une hypertrophie (élargissement) et d'une hyperplasie (croissance) cellulaire. La maladie apparaît sur les organes aériens de la plante tels que les feuilles, fruits et rameaux (Civerolo, 1984) (Figure 3). Il n'y a pas de vascularisation de la bactérie (Brunings and Gabriel, 2003).

4.3. Modes de survie et de dissémination ; stratégies de lutte

L'infection par *Xcc* se fait soit via des ouvertures naturelles (stomates) sur des tissus en croissance (Graham et al., 1992) soit via des blessures sur des tissus en croissance ou non. Les blessures peuvent être provoquées par le vent, la taille (Koizumi and Kuhara, 1980) et les insectes comme la mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrella* (Goto, 1992; Graham et al., 2004). En présence d'eau libre sur les lésions, les bactéries sont libérées et peuvent se disperser sur d'autres plantes ou organes (Gottwald et al., 2002) (Annexe 2). *Xcc*

possède une capacité de survie supérieure à un an dans les lésions foliaires et les chancres des rameaux qui constituent ainsi la principale source d'inoculum (Goto, 1992). La capacité de survie des bactéries hors de l'hôte est très limitée (Gottwald et al., 2002). La dissémination de *Xcc* peut être réalisée sur de courtes distances lors d'épisodes associant vent ($> 8 \text{ m.s}^{-1}$) et pluie. La dispersion à longue distance est également possible, par l'action de l'homme lors de (i) l'entretien des vergers et des pépinières par l'utilisation d'outils, machines ou vêtements contaminés, et (ii) mouvements de matériel végétal (greffons, plants et, dans une moindre mesure, fruits) qui jouent alors un rôle clé dans la dispersion de la maladie à l'échelle locale et mondiale. La dispersion peut aussi, mais plus rarement, se faire par des cyclones sur des distances pouvant atteindre quelques dizaines de kilomètres (Gottwald et al., 2001; Irej et al., 2006).

En l'absence d'un contrôle drastique, l'établissement de la bactérie peut conduire à des pertes directes (diminution des rendements en fruits et de la qualité) et indirectes (interdiction d'exportation de fruits frais) (Civerolo, 1984). L'éradication (arrachage complet d'arbres infectés, etc.) demeure la meilleure solution en termes de coût/bénéfice si elle est initiée précocement avec des moyens adaptés, et permet d'éliminer complètement la maladie ou de la maintenir à un seuil proche de zéro. Mais, en raison de l'extrême difficulté associée à l'éradication complète du CAA, plusieurs régions agrumicoles menacées par la maladie s'appuient sur une autre stratégie (Gottwald & Irej 2007). La stratégie alternative repose ainsi sur la protection intégrée des cultures⁹ visant à protéger les organes sensibles, limiter la dispersion de la bactérie et supprimer les sources d'inoculum (Gottwald et al., 2002) (installation de haies brise-vent, utilisation d'un système d'irrigation au goutte à goutte, destruction de branches infectées, etc.).

5. Problématique et objectifs du stage

Comme décrit auparavant, les souches du pathotype A de *Xcc* ont une large gamme d'hôtes et sont responsables de la grande majorité de l'impact agronomique du CAA. De récentes études de diversité génétique (cf paragraphe 3.4) ont montré qu'il existait deux sous-groupes génétiques au sein du pathotype A (DAPC 1 et 2). Un des objectifs de l'équipe BIORISK est de caractériser biologiquement les souches de ces sous-groupes ; et c'est dans ce cadre que s'inscrit la présente étude. Cette étude se focalise sur une des composantes du fitness, i.e. la multiplication *in planta* qui est la capacité de l'agent pathogène à se reproduire dans son hôte végétal (Leach et al., 2001). Il y a peu de données sur les cinétiques de multiplication *in planta*, et elles ont principalement visé à comparer des cultivars ou espèces d'agrumes (Graham et al., 1992) ou des souches phylogénétiquement très distantes (Bui Thi Ngoc et al., 2010).

Traditionnellement, il existe deux techniques de dénombrement des bactéries sur milieux de culture permettant d'étudier la multiplication *in planta* : (i) la culture sur milieu semi-sélectif et (ii) l'utilisation de mutants résistants à un ou plusieurs antibiotiques permettant de sélectionner facilement la souche cible sur

⁹ Protection intégrée des cultures : conception de la protection phytosanitaire fondée sur la connaissance du milieu et de la dynamique des populations présentes dans les agro-écosystèmes. Son application fait intervenir, de façon aussi compatible que possible, des mesures indirectes et directes de protection capables de maintenir les bioagresseurs au dessous des seuils de dégâts économiques, tout en satisfaisant aux exigences d'ordre écologique, toxicologique et économique (<http://agriculture.gouv.fr/ecophytopic>).

milieu sélectif. Cependant, ces deux méthodes présentent des limites. Pour la première, la compétition entre bactéries pose problème : sur milieu semi-sélectif, des bactéries de la flore saprophytes peuvent se développer rapidement et entraver la multiplication de la bactérie cible. Il risque alors d'y avoir une sous-estimation de la population bactérienne cible. Quant à la seconde méthode, l'acquisition de résistance s'accompagne souvent d'un coût biologique pour la bactérie (Lenski, 1997; Andersson and Levin, 1999), pouvant se traduire par une moindre croissance *in vitro* ou des capacités de colonisation, de transmission ou un pouvoir pathogène réduits. Les mutants résistants aux antibiotiques auront donc souvent un fitness amoindri par rapport à la souche sauvage, ce qui apporte d'entrée un biais sur des expérimentations concernant la mesure de la multiplication *in planta*.

La présente étude se focalise sur une démarche expérimentale où sont élaborées différentes méthodologies permettant (i) d'étudier la multiplication *in planta*, (ii) d'outrepasser les limites rencontrées avec les méthodes traditionnelles de dénombrement. L'objectif général est de développer et d'évaluer la pertinence de deux outils moléculaires capables de mesurer la multiplication *in planta* chez des souches invasives de *Xcc* appartenant au pathotype A : la qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) et la qRTPCR (*quantitative Reverse Transcription PCR*), basés sur l'amplification en temps réel de l'ADN et de l'ARN messager¹⁰ (ARNm) respectivement. La pertinence de ces deux techniques est par la suite évaluée sur des cinétiques de croissance *in vitro* et *in planta*, en comparaison avec une méthode traditionnelle de dénombrement bactérien. La qPCR est un outil classique et facile d'utilisation. Des expérimentations en qPCR ont été menées dans l'équipe chez *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (bactérie responsable du feu bactérien chez l'anthurium) et ont montré une bonne corrélation entre la méthode de dénombrement sur milieu de culture et la qPCR. La qPCR semblait ainsi être un bon outil pour la quantification de cette bactérie (comm. pers. Isabelle Robène-Soustrade). Cependant, l'ADN une molécule stable qui peut persister après la mort cellulaire. La qPCR peut alors conduire à une surestimation de bactéries vivantes *in situ* et ne permet donc pas de différencier les bactéries vivantes des mortes. Contrairement à l'ADN, l'ARN est significativement moins stable en dehors de la cellule (Birch et al., 2011) et hautement corrélé avec la physiologie cellulaire (Poulsen et al., 1993). La qRTPCR, en ciblant spécifiquement l'ARNm, permettrait donc de ne détecter que les bactéries viables. Pour cela, des marqueurs d'ARNm provenant de gènes impliqués dans la survie, le fitness et les mécanismes métaboliques généraux de *Xcc* sont évalués pour leur pertinence en tant que marqueurs de viabilité en utilisant la technique de qRTPCR. La qRTPCR serait *a priori* plus sensible que la qPCR car permettrait d'amplifier plusieurs transcrits d'ARNm pour une seule copie d'ADN (chaque marqueur étant présent en une seule copie d'ADN). Un des autres objectifs de l'étude est ainsi de déterminer si la qRTPCR, facilement à la portée d'un laboratoire de recherche, peut être utilisée pour évaluer quantitativement la viabilité bactérienne de *Xcc*.

¹⁰ ARNm : copie d'un gène synthétisée par transcription de l'ADN, codant pour une ou plusieurs protéines (<http://www.edu.upmc.fr/>).

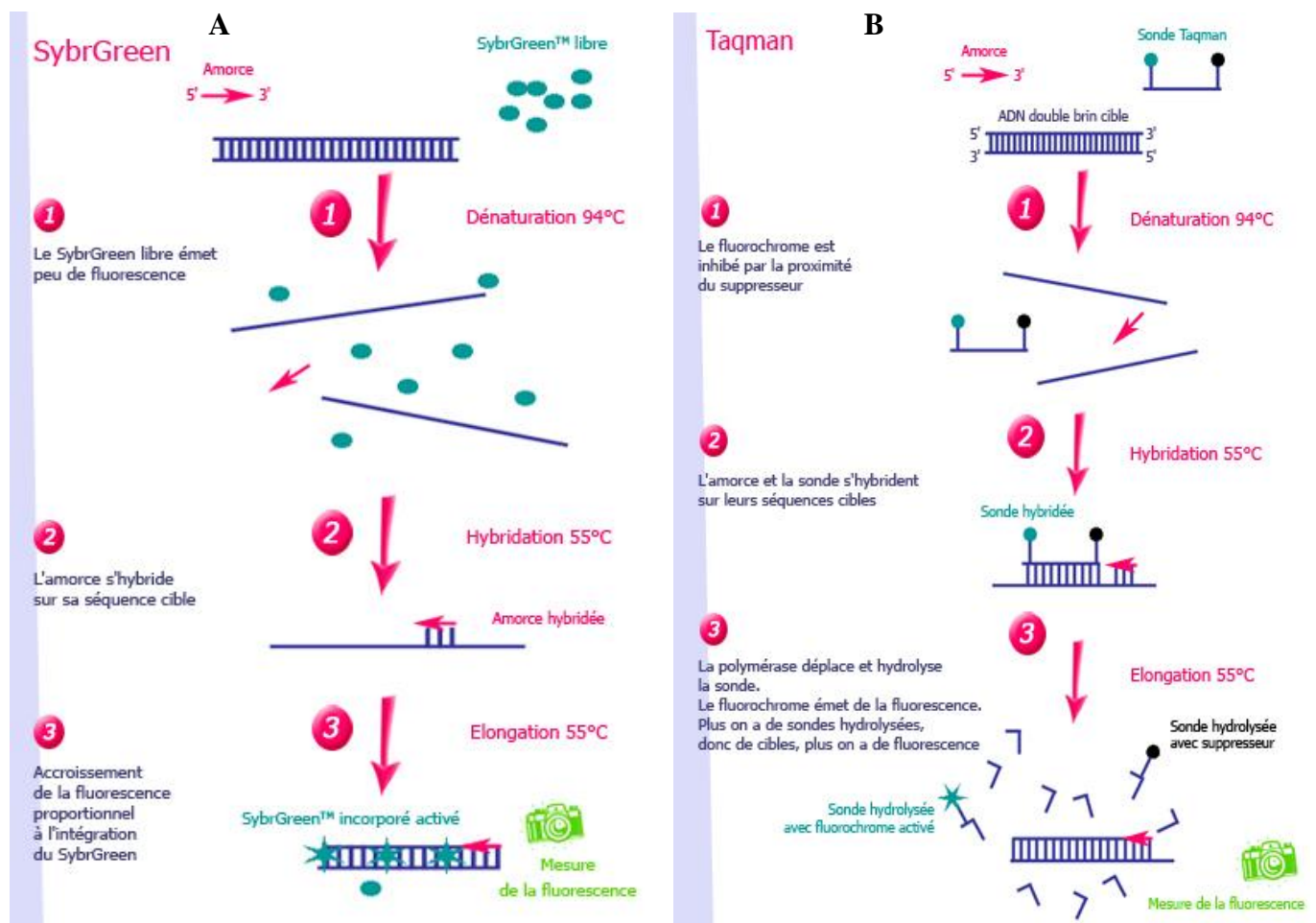


Figure 4. Principe de la qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction* : PCR quantitative ou PCR en temps réel) par les systèmes SYBR®Green (A) et Taqman (B) (D'après Poitras and Houde, 2002; Ameziane et al., 2006).

Plusieurs systèmes de détection sont utilisés pour la détection ou la quantification du signal fluorescent en temps réel : les agents intercalants (i.e. molécules capables de s'insérer entre les bases appariées d'un acide nucléique) et les sondes. Actuellement, l'agent intercalant le plus utilisé est le SYBR®Green, plus sensible et moins toxique que le Bromure d'Ethidium (BET) (A). L'agent intercalant, peu fluorescent à l'état libre, doit (i) augmenter en fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin, et (ii) ne pas inhiber la réaction de PCR. L'augmentation de la fluorescence mesurée pendant l'étape de polymérisation est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés (amplicons). L'émission fluorescente décroît complètement lors de l'étape de dénaturation du cycle suivant. Dans ce système, la spécificité de la réaction ne repose que sur la spécificité des amorces, sans contrôle de la taille des amplicons. Pour vérifier qu'un seul produit PCR a été amplifié, on réalise une courbe de fusion en fin de réaction. La courbe de fusion permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. Elle correspond à la variation de la fluorescence en fonction de la température. La température de fusion des amplicons, appelée T_m , est représentée par un pic unique sur la dérivée primaire de cette courbe. Il existe quatre technologies utilisant des sondes, et seule la Taqman (ou hydrolyse de sondes) est détaillée ici (B). Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome

II. MATERIELS ET METHODES

1. Mise au point des outils de qPCR et de qRTPCR

Cette étude porte sur une collection de trois souches mondiales typiques de *Xcc* appartenant au sous-groupe DAPC 1 du pathotype A : IAPAR 306, JJ238.17 et JK4.1. Ces souches sont disponibles dans les collections du CIRAD - 3P de La Réunion.

1.1. Principe de la qPCR et de la qRTPCR

La PCR quantitative (ou PCR en temps réel) repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification (Figure 4). Dans le cas de la qRTPCR, une étape de transcription inverse est appliquée aux ARNm extraits. Puis la qPCR se déroule dans les mêmes conditions que précédemment, à partir des ADN complémentaires (ADNc) générés par cette première étape (Poitras and Houde, 2002; Ameziane et al., 2006).

1.2. Choix du marqueur nucléotidique

Plusieurs contraintes sont associées à la mise au point des techniques, et notamment au niveau du choix du marqueur nucléotidique amplifié dans le test de qRTPCR. (i) Tout d'abord, il est nécessaire de trouver un marqueur adéquat, en relation avec la viabilité de la bactérie, afin de n'amplifier que la portion viable des bactéries (i.e. si la cellule meurt, ce marqueur doit être rapidement dégradé et ne plus être détectable en qRTPCR). Néanmoins, il est nécessaire de tester différentes cibles d'ARN car il a été montré à l'aide d'un marqueur de viabilité (*gumD*) que certains ARN de *Xcc* étaient détectables après la mort de la cellule bactérienne (Golmohammadi et al., 2012). (ii) Ensuite, l'amplification de ce marqueur doit refléter la croissance bactérienne, indépendamment des conditions environnementales. (iii) Enfin, il faut cibler idéalement un marqueur pour lequel il existe quelques mismatches¹¹ entre souches exploitables en technologie Taqman, permettant de discriminer les différents groupes intrapathotypes de *Xcc*.

1.2.1. Analyses *in silico* : recherche de marqueurs nucléotidiques

Des séquences complètes d'une trentaine de souches de *Xcc* ainsi qu'une liste de gènes répertoriés sur l'ensemble du génome ont été utilisées pour les analyses *in silico* (Barbarin, 2013). Ces séquences ont été assemblées et alignées à l'aide des logiciels Geneious (v. 5.5, Biomatters Ltd) et NCBI-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primers-blast/>). Une dizaine de gènes ont été sélectionnés pour lesquels un à deux mismatches discriminent les deux sous-groupes génétiques DAPC 1 et 2. Une base de données « RNA seq » obtenus pour différentes souches de *Xcc* a également été utilisée afin de déterminer si les gènes étaient constitutifs ou non. Les transcrits des différents souches ont été obtenus dans deux conditions différentes : en milieu minimum ainsi qu'en milieu mimant les conditions *in planta*. Les gènes pour lesquels le niveau de transcription ne changeait pas de manière significative entre les conditions ont été sélectionnés.

¹¹ Mismatch : mésappariement des brins d'ADN entraînant des différences d'enchaînement de nucléotides (<http://www.edu.upmc.fr/>).

émetteur (« reporter ») (par exemple 6-FAM : 6-carboxyfluorescein), et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (« quencher ») fluorescent ou non (par exemple TAMRA : 6-carboxy-tetramethylrhodamine) qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorce.

Tableau 1. Séquence, fonction et taille de fragment attendu (en paire de bases, pb) des amorces et sondes utilisées pour les amplifications par qPCR et qRT-PCR des souches de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*).

Amorces (F/R) et Sondes	Gène cible	Séquence (5'-3')	Fonction	Taille de l'amplicon (pb)
MG-gumD1F	gumD	CATTGCAGTGGGCGTCAAGT	glucosyl-1-phosphate transférase	445
MG-gumD1R	/	CGACCAACGGCGGATGTAGT		
J-GumD	/	FAM-AATGGTTTCCGTGGCGAGACC-MGB		
MG-gumD2F	gumD	GGCGCAGGTGAATGGTTT	glucosyl-1-phosphate transférase	69
MG-gumD2R	/	TCGTACTGGATACGCTTCTTCATC		
J-GumD	/	FAM-AATGGTTTCCGTGGCGAGACC-MGB		
XAC-0257F	aceA	CGGATCAATCGCTATACC	isocitrate liase	60
XAC-0257R	/	TATTGTTGATGCGCTTGAC		
XAC-0257	/	FAM-CCGATTCCGTGCC-MGB		
XAC-2685F	truB	CAGGTGGCCGTATTCG	tRNA pseudouridine synthase B	94
XAC-2685R	/	CAGTCCATTGAATAATCGTTGT		
XAC-2685	/	FAM-ACGGAACCCCTCCGGAC-MGB		
XAC-2763F		GCTCGAACTTCGTCAACATC	extracellular protease	58
XAC-2763R		ATCGTCAGCTGGCCGTTGT		
XAC-2763		FAM-ACAATGCGCTCGAC-MGB		
XAC-3745F		GAATGGGAGTTGCACTACTG	conserved protein of unknown function	60
XAC-3745R		GCGCTTGATGTCTGCTTC		
XAC-3745		FAM-CGCGCAACTGGG-MGB		
XAC-3749F		GCCCTTCCATCGACAAT	conserved protein of unknown function	75
XAC-3749R		GGATGGATCGACCATGAC		
XAC-3749		FAM-TCTGCGAACGCTG-MGB		
XAC-3774F		ATTGGCCGATGGTCTTG	conserved protein of unknown function	100
XAC-3774R		CAACTGATGCAGCACGAA		
XAC-3774		FAM-CATCGTGCTAGCAAAA-MGB		
XAC-3776F		ATCGGCCACTGGAGAGCGATA	conserved protein of unknown function	56
XAC-3776R		CGACGAACATCGCATACG		
XAC-3776		FAM-CGGGTTATGGGTG-MGB		
XAC-3780F		CGATCATGAAGGTCTTCGA	chloride channel	48
XAC-3780R		CGATCACGGCCAACTC		
XAC-3780		FAM-ACGCCCCAGGCAGA-MGB		
XAC-3781F		TCCAGTGCGGTAATGGT	conserved protein of unknown function	67
XAC-3781R		GAGAACGAATAACCCAACAC		
XAC-3781		FAM-TGTTGGTGGCCAATACCGTCGT-MGB		
XAC-3791F	yncA	AATTCCACTGCGCTGTACGA	N-acyltransferase YncA	54
XAC-3791R	/	AGCCGACCATGCTTTCC		
XAC-3791	/	FAM-TACCGTCCCCGGC-MGB		

Grâce à ces données transcriptomiques et génomiques, dix couples d'amorces ainsi que les sondes associées, permettant d'amplifier les zones de mutations, ont par la suite été « désignés » (dessinés) (Tableau 1). Deux paires d'amorces du gène *gumD*, MG-gumD1 et MG-gumD2, sont également utilisées dans cette étude selon des résultats obtenus dans de précédentes études (Scuderi et al., 2010; Golmohammadi et al., 2012). Les amorces et les sondes sont fournies par Applied Biosystems® (Courtaboeuf, France).

1.2.2. Aptitude des gènes candidats à refléter la viabilité des cellules bactériennes

Les gènes sélectionnés par les analyses *in silico* sont par la suite triés en fonction de leur capacité à refléter ou non la viabilité des bactéries (i.e. amplification des ARNm des bactéries vivantes). Pour cela, des expérimentations visant à évaluer la détection des différents ARNm après la mort cellulaire sont menées. Elles sont effectuées en comparant les amplifications par qRT-PCR des différents marqueurs ARNm à partir de suspensions de cellules vivantes et de cellules inactivées par la chaleur.

1.3. Etapes de la mise au point de la qRT-PCR

1.3.1. Souche bactérienne utilisée - Préparation de la souche et conditions de culture

La souche IAPAR 306 est utilisée pour la mise au point de la méthode. Cette souche est conservée à -80°C sur des billes microporeuses (Tubes Cryobank® ; Prolab Diagnostics, Austin, TX). Sous une hotte à flux laminaire, une bille de la souche est prélevée à l'aide d'une aiguille, placée dans un bouillon nutritif (Annexe 3a) et mise en agitation à 170 rpm (rotation par minute) pendant 24 heures à 28°C dans une étuve. Après ces 24 heures d'incubation, 50 µL sont prélevés etensemencés en « trois secteurs » sur milieu LPGA (Annexe 3b) en boîte de Pétri selon la technique par épuisement (Annexe 1). Ces boîtes de culture sont mises à incuber dans une étuve à 28°C pendant trois jours. Après une croissance de trois jours, les colonies caractéristiques de *Xcc* sont observables. Ainsi, une colonie de *Xcc* est prélevée et étalée en « pâte » à l'aide d'une anse de 1 µL à nouveau sur milieu LPGA afin de permettre la multiplication bactérienne.

1.3.2. Traitement d'inactivation - Viabilité et cultivabilité des cellules bactériennes

Après une croissance de 24 heures, la souche est prélevée à l'aide d'une anse de 1 µL et mise en suspension dans 5 mL de tampon Tris (0,01 M, pH = 7,2 ; Sigma). La concentration bactérienne est ajustée à environ 10^8 CFU.mL⁻¹ dans du tampon Tris par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific™ Genesys 20), puis diluée de 10 en 10 jusqu'à 10^4 CFU.mL⁻¹. A l'aide de l'ensemencement automatique easySpiral® Pro (InterScience, Angers), 50 µL de la solution à 10^4 CFU.mL⁻¹ sont étalés sur milieu LPGA. La numération bactérienne est effectuée après 72 heures d'incubation à 28°C par la méthode de comptage Spiral, en dénombrant manuellement les colonies à l'aide d'une grille de comptage Spiral standard placée sous la boîte ensemencée (Guide d'installation et d'utilisation easySpiral® Pro 2011) (Annexe 4).

Pour déterminer la concentration minimale, la température et le temps nécessaires à l'inactivation des bactéries, les différentes suspensions de 10^5 à 10^7 CFU.mL⁻¹ sont soumises à une série de traitements à différents temps et températures dans un thermocycleur : (i) 80°C pendant 30 minutes à trois heures, et (ii) 90°C pendant 30 minutes à trois heures. Après ces traitements, des étalements sont réalisés afin de vérifier si les bactéries sont cultivables ou non : 50 µL de chaque échantillon sont étalés au râteau sur boîte LPGA à l'aide d'un étaloir. L'observation des colonies bactériennes est effectuée après 72 heures d'incubation à 28°C. Les échantillons sont ensuite conservés à -4°C pendant trois heures afin de s'assurer que l'ARN bactérien des échantillons traités ne soit plus détectable. Après ces trois heures, une coloration de Gram (Annexe 5) est réalisée sur les échantillons afin de vérifier leur intégrité cellulaire : les bactéries doivent être inactivées mais non lysées (i.e. pas de mort totale), car sinon la dégradation totale de l'ARN se produit (Golmohammadi et al., 2012).

1.3.3. Extraction et purification de l'ARN

L'extraction d'ARN des bactéries inactivées et non inactivées est réalisée à l'aide d'un kit « RNeasy® Mini kit » (Qiagen) selon le protocole préconisé par le fournisseur, précédé d'étapes préliminaires extraites de la publication de Golmohammadi et al. (2012). L'ARN extrait est ensuite purifié par traitement à la DNase permettant ainsi la digestion des ADN et la stabilité des ARN, à l'aide du kit « Turbo DNA-free DNase kit » (Ambion) (Life Technologies, Grand Island, NY) (Annexe 6). La concentration d'ARN extrait et sa qualité sont contrôlées par spectrophotométrie, à l'aide du NanoDrop® ND-8000 et du logiciel associé ND8000 v. 2.2.1 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE 19810 Etats-Unis). L'ARN est ensuite conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation en qRT-PCR.

1.3.4. Amplifications de l'ARN par qRT-PCR et RT-PCR

Des amplifications par qRT-PCR sont réalisées sur les ARN extraits à l'aide des techniques SybrGreen et/ou Taqman, en utilisant les 10 couples d'amorces dessinés auparavant, et les deux couples d'amorces du gène *gumD* (avec les sondes respectives en Taqman). Les amplifications par qRT-PCR sont réalisées en deux étapes : (i) l'amplification à l'aide de la transcriptase inverse (Promega) sur 3 µL d'ARN dans 17 µL de mélange réactionnel à l'aide du thermocycleur GeneAmp PCR System 9700, et (ii) l'amplification par qPCR sur 2 µL d'ADNc dans 18 µL de mélange réactionnel à l'aide du thermocycleur StepOnePlus™ System (Applied Biosystems®, Courtaboeuf, France) couplé au logiciel StepOnePlus™ (v. 2.2) (Annexe 7). Chaque échantillon est testé en duplicats ou triplicats. Lors de résultats non attendus en SybrGreen (obtention de plusieurs pics à des températures différentes ou des pics décalés par rapport au T_m attendu), des amplifications par RT-PCR conventionnelle en une seule étape (Platinum) sont réalisées en parallèle sur 2 µL d'ARN dans 23 µL de mélange réactionnel, à l'aide du thermocycleur GeneAmp PC

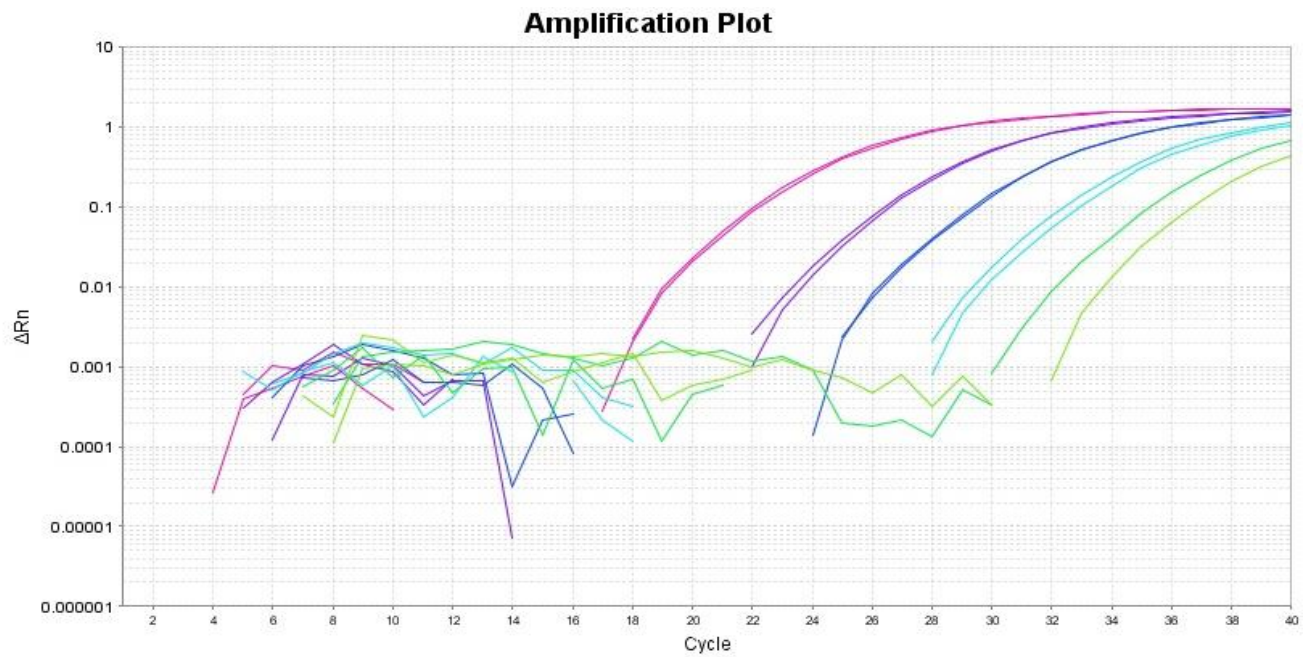


Figure 5. Exemple de courbes d'amplification obtenues par qRTPCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) ou qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) en Taqman avec le logiciel StepOnePlusTM v2.2. L'émission de fluorescence du reporter, normalisée à l'émission de fluorescence d'un reporter de référence (i.e ROXTM), figure en ordonnées (ΔRn). Le nombre de cycles figure en abscisses. Les différentes couleurs correspondent aux différents puits (contenant mix et matériel biologique) (A. Damour, 2014).

System 9700 (Annexe 8) afin de vérifier la présence et la taille des amplicons. Les amplicons sont déposés sur gel d'agarose (8 µL de produit PCR mélangés à 1 µL de bleu de charge) et séparés par électrophorèse. Les gels sont révélés au BET (2 µg.mL⁻¹) et rincés au TAE. La visualisation des amplicons est effectuée aux UV à l'aide du transilluminateur ETXF26.M couplé d'une camera CFW-1300 et du logiciel PerfectImage v. 7.6. La taille des fragments générés est déterminée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire.

1.3.5. Détection des ARNm des différentes cibles

Les technologies SybrGreen et Taqman permettent de déterminer le nombre de cycles de PCR à partir duquel la fluorescence du reporter a atteint un cycle seuil : le Ct (threshold cycle). Le Ct est proportionnel au logarithme de la quantité d'ARN cible et donc au logarithme de la concentration bactérienne. Une approche qualitative est réalisée dans le but de détecter les ARNm des différentes cibles. Un Ct moyen est calculé pour les échantillons traités et non traités et pour chaque couple d'amorces testé. Les données de Ct sont soumises à des analyses de variance (ANOVA). (Un exemple de courbes d'amplification obtenues par qRTPCR ou qPCR en Taqman est montré en figure 5).

1.4. Amplification de l'ADN par qPCR

La spécificité de chaque couple d'amorces de *Xcc* est testée par qPCR à partir d'ADN des différentes souches de *Xcc*. L'extraction d'ADN est réalisée à partir des trois souches de *Xcc* (précédemment citées) à l'aide d'un kit « DNeasy® Mini kit » (Qiagen) selon le protocole préconisé par le fournisseur (Annexe 9). La concentration d'ADN ainsi extrait et sa qualité sont contrôlées par spectrophotométrie, à l'aide du NanoDrop® ND-8000 et du logiciel associé. L'ADN est conservé à -30°C jusqu'à l'utilisation en qPCR. Les amplifications par qPCR sont réalisées sur les ADN extraits à l'aide des techniques Taqman et/ou SybrGreen, en utilisant les 10 couples d'amorces dessinés auparavant (avec les sondes respectives en Taqman). Les amplifications par qPCR sont réalisées à l'aide du kit « Universal PCR Master Mix » (Applied Biosystems®) sur 2 µL d'ADN dans 18 µL de mélange réactionnel (Annexe 10) à l'aide du thermocycleur StepOnePlus™ couplé au logiciel StepOnePlus™.

2. Application de la qPCR et de la qRTPCR *in vitro*

2.1. Caractérisation des paramètres de croissance bactérienne *in vitro*

Avant de réaliser des expérimentations de mesure de la croissance des bactéries *in planta*, il est nécessaire d'étudier les paramètres de croissance *in vitro* des souches, i.e. la vitesse de croissance et le temps de générations. Des cinétiques (i.e. suivi de la croissance dans le temps) sont réalisées par suivi de la DO à 600 nm des cultures bactériennes en croissance sur milieux synthétiques. Un milieu riche (LPG, Annexe 3c) et un milieu minimum (XVM2, Annexe 3d) sont pour cela utilisés. Contrairement à un milieu riche, le milieu minimum XVM2 mime les conditions nutritives *in planta* et induit l'expression du système *hrp* chez *Xanthomonas euvesicatoria* (Wengelnik et al., 1996). Les trois souches précédemment nommées

(cf paragraphe 1.3.1) sont désormais utilisées, et sorties de la cryobanque à -80°C comme décrit plus haut (cf paragraphe 1.3.2). Après une croissance de 24 heures, chaque souche est prélevée à l'aide d'une anse de 1 μL et mise en pré-culture comme suit : (i) dans 5 mL de milieu LPG, et (ii) dans 15 mL de milieu XVM2, à raison de quatre répétitions par souche. La concentration bactérienne est ajustée à environ 10^8 CFU.mL^{-1} par mesure de la DO à 600 nm. Les souches sont ensuite mises en agitation à 170 rpm pendant 24 heures à 28°C dans une étuve. Le lendemain, les DO sont à nouveau mesurées et ajustées à 10^8 CFU.mL^{-1} . Cinq microlitres de ces solutions à 10^8 CFU.mL^{-1} sont mis en culture dans un erlenmeyer contenant 50 mL de milieu LPG ou XVM2 : il s'agit d'une dilution au $1/10.000^{\text{ème}}$ afin de commencer la cinétique à 10^4 CFU.mL^{-1} . Les souches sont remises en agitation entre chaque temps de prélèvement. Les cinétiques sont suivies par DO avec un intervalle de mesure de trois heures durant trois jours.

Les temps de génération des souches ont varié entre 1h40 et 1h48, et entre 2h15 et 2h20 respectivement pour les milieux LPG et XVM2. La vitesse de croissance a été évaluée à six heures sur milieu LPG et à huit sur milieu XVM2. Les résultats obtenus ici permettent par la suite de caractériser les cinétiques de croissance bactérienne *in vitro* et *in planta* et ainsi de mettre en parallèle la croissance bactérienne avec la production d'ARNm de gènes constitutifs des souches. Si les gènes choisis répondent aux critères exigés, la croissance bactérienne et leur expression doivent suivre la même courbe.

2.2. Caractérisation des cinétiques de croissance bactérienne *in vitro*

Les souches sont mises en pré-culture et en culture comme expliqué précédemment (cf paragraphe 2.1). Les cinétiques de croissance sont suivies sur six temps T consécutifs, i.e. de T0 à T5, correspondant respectivement à des concentrations bactériennes de 10^4 à 10^9 CFU.mL^{-1} . Les cultures et les cinétiques débutent ainsi à T0, car il a été montré que la cinétique pouvait être difficilement suivie de 10^0 à 10^3 CFU.mL^{-1} . Les prélèvements ont lieu toutes les huit heures pour le milieu XVM2, et toutes les six heures pour LPG. A chaque temps T, des prélèvements sont effectués de la façon suivante : (i) 1 mL de solution de chaque répétition est prélevé pour l'extraction d'ARN et 1 mL pour l'extraction d'ADN. (ii) Cinquante microlitres de solution (diluée à 10^4 CFU.mL^{-1}) sont étalés sur milieu LPGA à l'aide de l'ensemencement automatique. La numération bactérienne est effectuée après 72 heures d'incubation à 28°C par la méthode de comptage Spiral.

2.2.1. Extraction de l'ARN et de l'ADN

L'extraction d'ARN est ensuite réalisée à l'aide d'un kit « RNeasy® Mini kit » (Qiagen) selon le protocole préconisé par le fournisseur. L'ARN extrait est ensuite purifié par traitement à la DNase comme expliqué précédemment. L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide d'un kit « DNeasy® Mini kit » (Qiagen) selon le protocole préconisé par le fournisseur. Les concentrations d'ARN et d'ADN extraits et leur qualité sont par la suite contrôlées et déterminées par spectrophotométrie. L'ARN est ensuite conservé à -80°C et l'ADN à -30°C jusqu'aux amplifications par qRT-PCR et qPCR respectivement.

2.2.2. Amplifications de l'ARN par qRTPCR et de l'ADN par qPCR

Les amplifications par qRTPCR et qPCR sont réalisées sur les ARN et ADN extraits à l'aide de la technique Taqman, en utilisant le témoin positif MG-gumD1 et deux couples d'amorces se révélant être des marqueurs aptes à refléter la viabilité des cellules bactériennes. Les amplifications par qRTPCR sont réalisées en une seule étape à l'aide du kit « Taqman® Fast Virus 1-Step Master Mix » (Applied Biosystems®) sur 1 µL d'ARN dans 9 µL de mélange réactionnel (Annexe 11) ; les amplifications par qPCR sont réalisées de la même façon sur l'ADN à l'aide du kit « Universal PCR Master Mix » (Applied Biosystems®) (Annexe 12). Les deux types d'amplifications sont effectués à l'aide du thermocycleur StepOnePlus™ couplé au logiciel StepOnePlus™. Chaque échantillon est testé en duplicats ou triplicats.

2.2.3. Quantification bactérienne par construction de courbes de gamme étalon

Une approche quantitative est suivie, basée sur la construction de courbes de gamme étalon, dans le but de déterminer la concentration bactérienne. Ces courbes étalons sont construites *in vitro* par qRTPCR ou qPCR à partir des ARN ou d'ADN extraits à chaque temps de prélèvement (et/ou par une série de dilution en 10), en utilisant les mêmes conditions de qRTPCR et qPCR Taqman que précédemment. Une gamme étalon est construite pour chacun des marqueurs. Les concentrations bactériennes obtenues *in vitro* par qRTPCR et qPCR sont par la suite comparées à celles issues des dénombrements sur milieu de culture. Des corrélations sont ainsi réalisées et permettent d'évaluer la pertinence et la sensibilité des deux méthodes.

3. Application de la qPCR *in planta*

3.1. Matériel végétal utilisé et dispositif expérimental

Une espèce d'agrumes est utilisée dans cette étude, le limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*), disponible dans la collection du CIRAD - 3P de La Réunion. L'expérimentation est menée en conditions contrôlées dans un rotoplan au sein du laboratoire NS2 du CIRAD (taux d'humidité relative : 88%, température : 28°C, photopériode : 12 heures).

3.2. Caractérisation des cinétiques de croissance bactérienne *in planta*

3.2.1. Souche bactérienne utilisée - Inoculation sur feuilles d'agrumes

L'expérimentation *in planta* est réalisée avec la souche IAPAR 306. Cette souche conservée à -80°C est mise en culture, isolée puis étalée en « pâté » sur milieu gélosé comme expliqué précédemment. Après une croissance de 24 heures, la souche est prélevée et une suspension bactérienne à 10^8 CFU.mL⁻¹ est préparée dans 5 mL de tampon Tris (ajustement par mesure de la DO à 600 nm). La suspension est diluée à 10^5 CFU.mL⁻¹ et inoculée sur de jeunes feuilles encore tendres et souples, et donc dépourvues de cuticule, se trouvant au même stade de développement (quasiment ou pleinement développées). L'inoculation se fait par infiltration à l'aide d'une seringue en la pressant doucement contre la face inférieure de la feuille, à



Figure 6. Inoculations par infiltration réalisées à l'aide d'une seringue contre la face inférieure de feuilles du limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*) (A. Damour, 2014).

raison de quatre infiltrations (répétitions) par feuille (Figure 6). Les zones infiltrées doivent être similaires et juste dépasser la zone de la seringue : i.e. 1 à 2 μL en contact avec la feuille, équivalents à une distance de 1 mm autour de l'embout de la seringue. Cette étape correspond au jour J0 de la cinétique de croissance bactérienne *in planta*. Le suivi de cinétique se fait ainsi sur six dates : à J0, J+3, J+7, J+9, J+14 et J+22, correspondant respectivement à des concentrations attendues de $10^2 \text{ CFU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, et de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 et $10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, à raison d'une feuille par date. A partir de J+3, des manipulations sont réalisées sur les feuilles de la façon suivante : à l'aide d'un scalpel ou d'une tige broyeur (Ultraturax®) préalablement stérilisé à l'éthanol à 70°, quatre morceaux de feuille d'environ 1 cm^2 contenant la zone infiltrée sont découpés. Ces quatre portions de feuille sont ensuite mises individuellement en sac (Extraction bags « Universal », Bioreba), contenant 5 mL de tampon Tris, et broyées à l'aide d'un vibrobroyeur à billes (Stomacher®400, Seward Medical, London, UK). Ensuite, 1 mL de solution de chaque répétition est prélevé pour l'extraction d'ADN. Puis, 50 μL de solution (diluée à $10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ à partir de J+9) sont étalés sur milieu KC-LPGA (Annexe 3e) à l'aide de l'ensemencement automatique. La numération bactérienne est effectuée après 72 heures d'incubation à 28°C par la méthode de comptage Spiral.

3.2.2. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide du kit « DNeasy® Plant Mini kit » (Qiagen) selon le protocole préconisé par le fournisseur (Annexe 13). Comme après chaque extraction, la concentration d'ADN extrait et sa qualité sont contrôlées et déterminées par spectrophotométrie. L'ADN est ensuite conservé à -30°C.

3.2.3. Amplifications de l'ADN par qPCR

Les amplifications par qPCR sont réalisées à l'aide de la technique Taqman de la même façon que pour les expérimentations *in vitro* (cf paragraphe 2.2.2).

3.2.4. Quantification bactérienne par construction de courbes de gamme étalon

La concentration bactérienne est déterminée à chaque temps à l'aide de courbes de gamme étalon construites *in planta* par qPCR à partir d'ADN extraits au préalable, en utilisant les mêmes conditions de qPCR Taqman utilisées précédemment. Une fois encore, une gamme étalon est construite pour chacun des marqueurs. Comme pour l'expérimentation *in vitro*, les concentrations obtenues par qPCR sont par la suite comparées à celles issues des dénombrements sur milieu de culture, et des corrélations entre les deux méthodes sont à nouveau réalisées.

4. Analyse des données

Les différentes analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel statistique R (v. 3.0.1). Une analyse de variances (ANOVA) est réalisée sur les moyennes de Ct lors de la mise au point de l'outil de

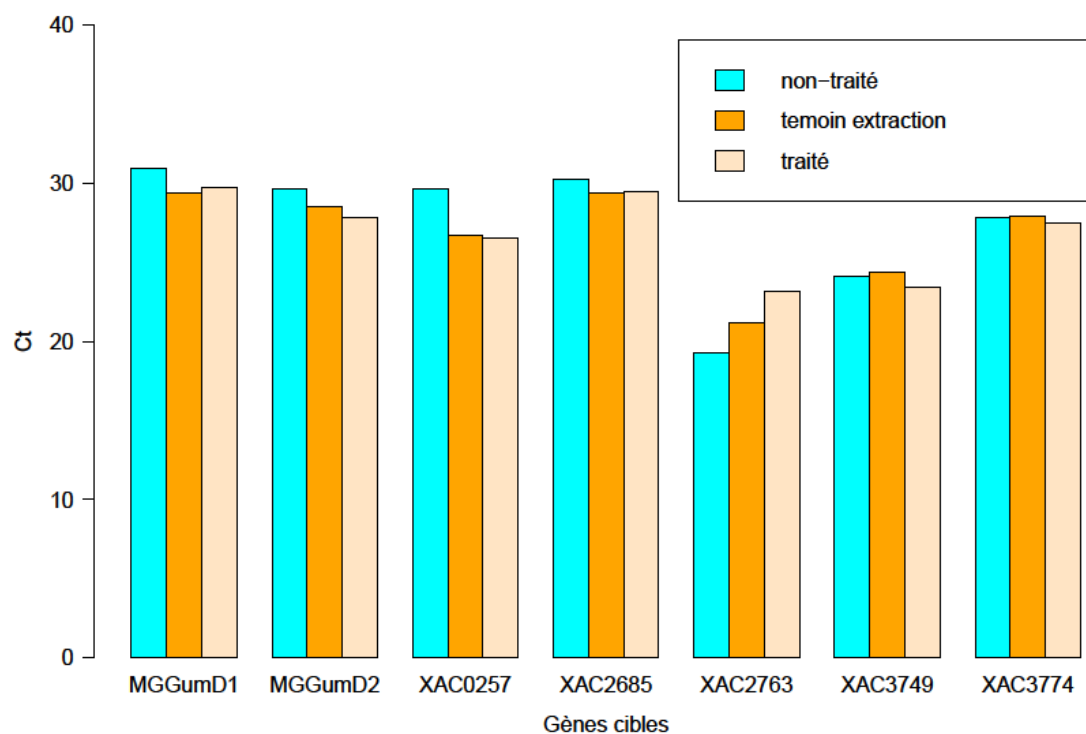


Figure 7. Valeurs moyennes des Ct en fonction des amorces cibles après qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) en SybrGreen de suspensions bactériennes, à une concentration de 10^5 CFU.mL⁻¹ de la souche IAPAR 306 de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), non traitées et traitées (incubées) à +80°C pendant 30 minutes. Les sept paires d'amorces (gènes cibles) sont : MG-gumD1F/ MG-gumD1R (*gumD1*), MG-gumD2F/ MG-gumD2R (*gumD2*), XAC-0257F/ XAC-0257R, XAC-2685F/ XAC-2685R, XAC-2763F/ XAC-2763R, XAC-3749F/ XAC-3749R et XAC-3774F/ XAC-3774R. Les moyennes sont données pour deux réactions par traitement et par paire d'amorces utilisées.

qRTPCR. Des analyses de régression sont ensuite réalisées pour les expérimentations *in vitro* et *in planta* afin de déterminer la corrélation statistique entre la méthode microbiologique et les méthodes moléculaires. Un coefficient de corrélation de Pearson est calculé et un test de Wilcoxon réalisé. Une P-value inférieure à 0.05 est considérée comme significative. Différentes formules sont calculées pour les analyses de la sensibilité et de l'efficacité d'amplification.

III. RESULTATS

1. Cultivabilité, viabilité et détection des ARNm après traitement à la chaleur : choix des marqueurs

Une approche qualitative est réalisée dans le but de détecter les ARNm des différentes cibles. Pour cette approche, il faut : (i) qu'il y ait un signal (i.e. une émission de fluorescence) lorsque les échantillons ne sont pas traités, (ii) qu'il n'y ait aucun signal lorsque les échantillons sont traités ou que le signal soit significativement plus élevé que celui des échantillons non traités, et (iii) qu'il n'y ait aucun signal pour les témoins d'extraction. Les témoins doivent être négatifs (auquel cas cela signifierait qu'il y a une contamination par du matériel biologique).

Au début de la mise au point, une solution à 10^5 CFU.mL⁻¹ est utilisée pour réaliser les extractions, et les expérimentations en qRTPCR sont menées par la technique SybrGreen (sondes Taqman non disponibles). Après un traitement à +80°C à cette concentration pendant 30 minutes, aucune colonie bactérienne n'est détectée sur boîtes de culture pour les échantillons traités. De plus, la coloration de Gram montre que l'intégrité cellulaire est conservée. Une analyse de variance (ANOVA à une composante) est en parallèle réalisée pour examiner la variation dans la quantité d'ARN entre les échantillons traités et non traités. La figure 7 et l'ANOVA indiquent non seulement qu'il y a des signaux pour les échantillons traités à la chaleur mais aussi qu'il n'y a pas de différence significative de Ct entre les échantillons traités et non traités ainsi que pour les témoins d'extraction (P-value = 0.562) pour les sept paires d'amorces utilisées en qRTPCR. A noter qu'aucune bande n'est détectée sur gel de RTPCR pour les échantillons non traités (Annexe 14). Les signaux des témoins d'extraction pourraient suggérer une éventuelle contamination des échantillons (même si les Ct sont en général plus élevés que ceux des non traités). Cette concentration ainsi que ces température et temps de traitement ne sont donc pas optimaux pour l'inactivation et la détection des bactéries chez *Xcc*.

Des essais d'optimisation de la méthode sont réalisés en augmentant la concentration bactérienne : une solution à 10^7 CFU.mL⁻¹ est désormais utilisée (qRTPCR toujours menées en SybrGreen). Après un traitement à +80°C à cette concentration pendant 30 minutes, aucune colonie n'est observée sur boîtes de culture pour les échantillons traités. La figure 8 et l'ANOVA indiquent les mêmes résultats que pour la concentration précédente : il n'y a pas de différence de Ct entre les échantillons traités et non traités et les témoins d'extraction (P-value = 0.305) pour les sept paires d'amorces utilisées en qRTPCR. A noter que sur gel de RTPCR, les bandes sont détectées dans les échantillons traités de la même façon que pour les non

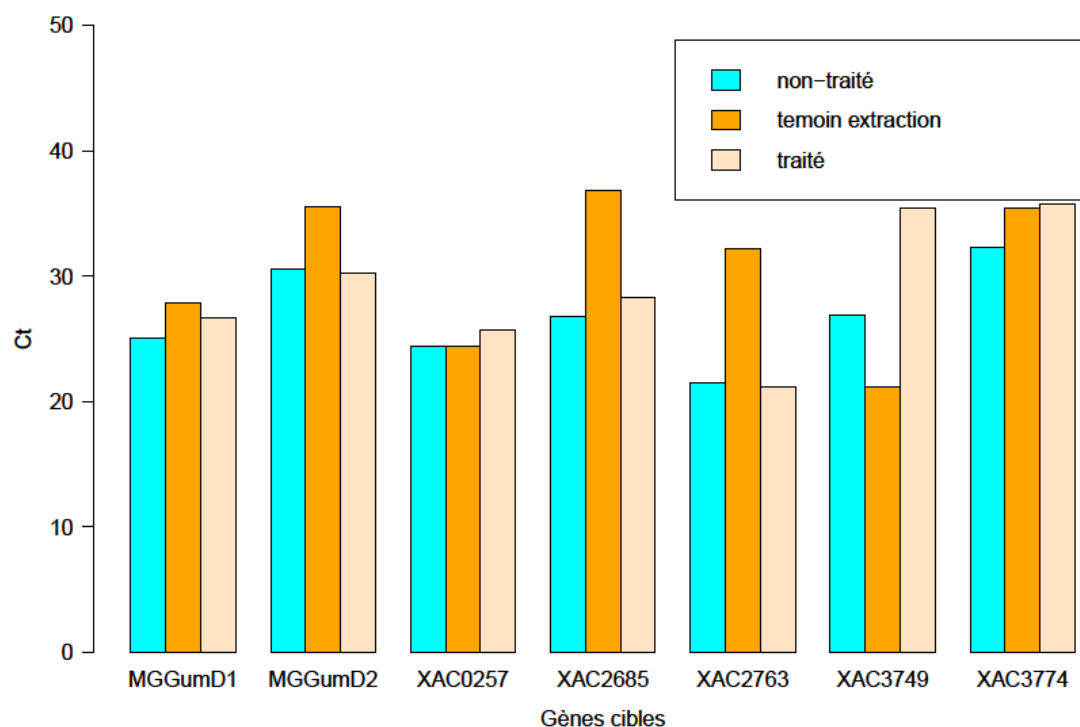


Figure 8. Valeurs moyennes des Ct en fonction des amorces cibles après qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) en SybrGreen de suspensions bactériennes, à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹ de la souche IAPAR 306 de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), non traitées et traitées (incubées) à +80°C pendant 30 minutes. Les sept paires d’amorces (gènes cibles) sont : MG-gumD1F/ MG-gumD1R (*gumD1*), MG-gumD2F/ MG-gumD2R (*gumD2*), XAC-0257F/ XAC-0257R, XAC-2685F/ XAC-2685R, XAC-2763F/ XAC-2763R, XAC-3749F/ XAC-3749R et XAC-3774F/ XAC-3774R. Les moyennes sont données pour deux réactions par traitement et par paire d’amorces utilisées.

traités (Annexe 15). L'absence de différence entre les échantillons traités et non traités (i.e. ARN bactériens toujours détectés après un tel chauffage) signifie que ce traitement n'est pas efficace pour inactiver les cellules bactériennes et n'est donc plus utilisée dans la suite de l'étude.

L'optimisation de la méthode se poursuit en augmentant le temps d'inactivation à trois heures. A partir de cette étape, des essais ont pu être réalisés en parallèle en SybrGreen et en technologie Taqman. A efficacité d'amplification égale, la technologie Taqman a été choisie, plus spécifique que la méthode SybrGreen. Avec un traitement à +80°C pendant trois heures à partir d'une solution à 10^7 CFU.mL⁻¹ (Figure 8) : (i) aucun signal n'est détecté pour les échantillons traités et ni pour les témoins d'extraction pour le marqueur MG-gumD1, et (ii) aucun signal n'est détecté pour les témoins d'extraction et une différence significative de Ct est présente entre les échantillons traités et non traités pour les marqueurs XAC-3776 ($Ct_{moyen} = 33.9$ et 29.4 pour les échantillons traités et non traités, respectivement) et XAC-3780 ($Ct_{moyen} = 36.2$ et 28.4 pour les échantillons traités et non traités, respectivement) ($P\text{-value} = 0.0392$). Seuls ces trois marqueurs répondent donc au critère de viabilité. Aucune cellule n'est détectée sur boîtes de culture ; et l'intégrité cellulaire est conservée. A noter que sur gel de RTPCR, des bandes ne sont détectées que pour les échantillons non traités (Annexe 16). Ces concentration, température et temps d'incubation sont donc utilisés pour les expériences d'inactivation à la chaleur car l'objectif est de travailler avec des bactéries intactes (i.e. non lysées) ne montrant pas d'activité, comme celles retrouvées en champs après des traitements bactéricides létaux. Les deux marqueurs XAC-3776 et XAC-3780, en plus de MG-gumD1 (Tableau 2), capables de refléter la viabilité des cellules, sont donc choisis pour les expérimentations *in vitro* et *in planta*. A noter que les résultats sont similaires pour les traitements à +90°C (données non présentées).

2. Mesure de la cinétique bactérienne *in vitro*

2.1. Cinétiques de la croissance bactérienne *in vitro* sur milieu riche (LPG) et minimum (XVM2) déterminées par dénombrement sur milieu de culture

Dans l'ensemble, et comme prévu, la croissance bactérienne est plus rapide sur milieu riche que sur milieu minimum (Figure 10). Elle suit une courbe de type sigmoïde, avec une phase de latence (pour le milieu minimum), une phase exponentielle et une phase stationnaire. Comme attendu, les concentrations débutent à 10^4 CFU.mL⁻¹ au temps T0 et atteignent 10^9 CFU.mL⁻¹ en phase stationnaire. Les répétitions sont dans l'ensemble bien homogènes (exception sur milieu minimum pour le temps T3 pour les souches IAPAR 306 et JK4.1, et le temps T4 pour JJ238.17). La phase exponentielle de croissance est plus rapide et homogène pour le milieu riche alors qu'elle est plus lente et saccadée pour le milieu minimum. La croissance bactérienne atteint la phase stationnaire au bout du temps T4 sur milieu riche (24 heures) alors qu'elle se fait plus difficilement au bout du temps T5 sur milieu minimum (40 heures). Globalement, la croissance bactérienne est plus homogène pour le milieu riche que pour le milieu minimum (quasiment identique pour les trois souches et pour chaque répétition pour le milieu riche).

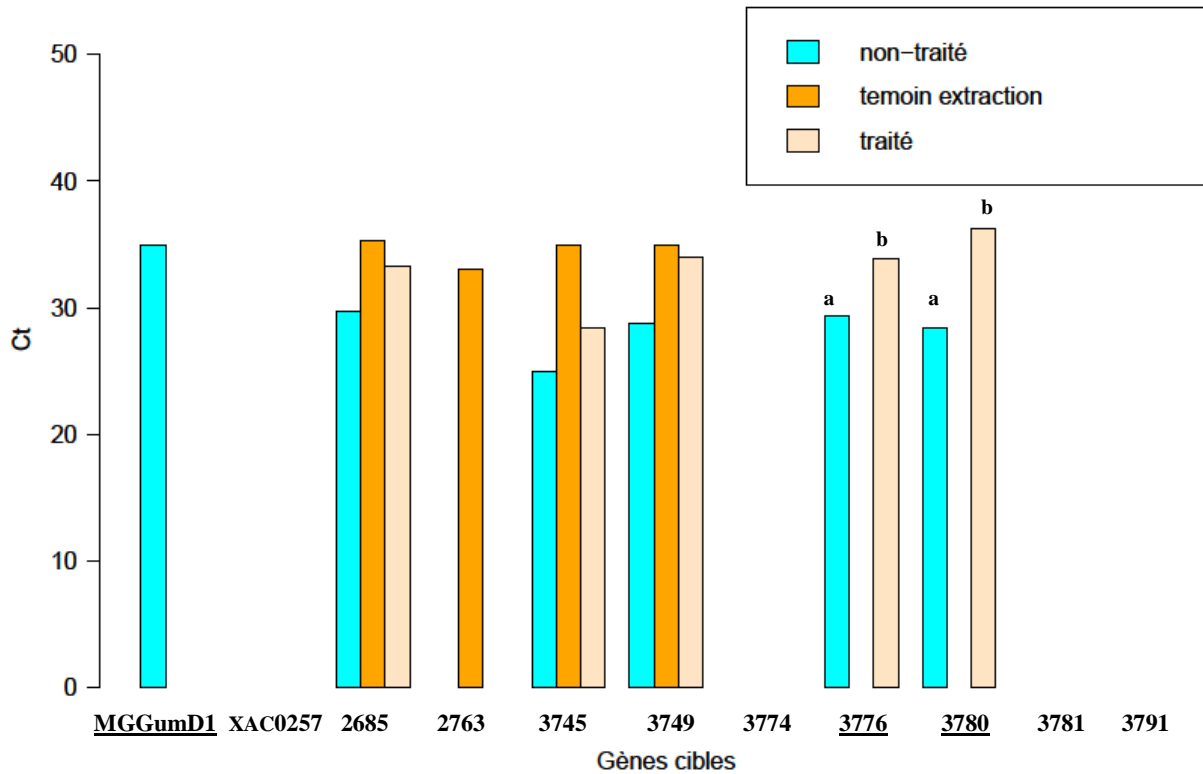


Figure 9. Valeurs moyennes des Ct en fonction des amorces cibles après qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) en Taqman de suspensions bactériennes, à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹ de la souche IAPAR 306 de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), non traitées et traitées (incubées) à +80°C pendant trois heures. Les 11 paires d’amorces (gènes cibles) sont : MG-gumD1F/ MG-gumD1R (*gumD1*), XAC-0257F/ XAC-0257R, XAC-2685F/ XAC-2685R, XAC-2763F/ XAC-2763R, XAC-3745F/ XAC-3745R, XAC-3749F/ XAC-3749R, XAC-3774F/ XAC-3774R, XAC-3776F/ XAC-3776R, XAC-3780F/ XAC-3780R, XAC-3781F/ XAC-3781R et XAC-3791F/ XAC-3791R. Les moyennes sont données pour deux réactions par traitement et par paire d’amorces utilisées. Seules les moyennes présentant une différence significative selon le test d’ANOVA (*ANalyse Of VAriance*) sont représentées ici (lettre différente pour une même paire d’amorces sont montrées ici) ($P < 0.05$).

2.2. Construction de courbes de gamme étalon en qPCR et qRTPCR (quantification bactérienne)

Comme montré par la figure 11, les valeurs de Ct (axe des y) sont bien corrélées à la concentration bactérienne (axe des x) pour la qPCR, avec un coefficient de corrélation (R^2) de 0.972, 0.976 et 0.991 respectivement pour les marqueurs XAC-3776, XAC-3780 et MGgumD1. Pour la qRTPCR : seuls les deux marqueurs XAC-3776 et XAC-3780 présentent de bons coefficients de corrélation (0.968 et 0.962 respectivement), mais qui sont néanmoins plus faibles comparés à ceux de la qPCR.

Dans l'ensemble, la méthode de qPCR apparaît beaucoup plus sensible que la qRTPCR : par exemple pour le marqueur XAC-3776, une concentration bactérienne d'environ 10^6 CFU.mL⁻¹ en qPCR correspond à une valeur de Ct de 27 environ, alors qu'en qRTPCR pour la même concentration le Ct est de 35 environ ; soit une différence de 8 Ct entre les deux méthodes pour ce marqueur. Pour XAC-3776, la qPCR est donc environ 256 fois plus sensible que la qRTPCR ($2^{\Delta Ct} = 2^{35-27} = 2^8$). De la même façon, la qPCR s'avère 16 fois plus sensible que la qRTPCR pour les deux autres marqueurs XAC-3780 et MGgumD1 ($2^{\Delta Ct} = 2^4$). La limite de détection en qPCR pour les marqueurs XAC-3776 et XAC-3780 est d'environ 10^3 CFU.mL⁻¹, et de 10^5 pour MGgumD1. En qRTPCR, la limite de détection est d'environ 10^4 CFU.mL⁻¹ pour XAC-3780, et de 10^5 pour XAC-3776 et MGgumD1.

Une comparaison des pentes montre des différences significatives entre les deux outils : de -4.171 à -3.146 pour la qPCR et de -3.534 à -2.608 pour la qRTPCR. Ces résultats indiquent ainsi des efficacités d'amplification ($((10^{-1/\text{pente}})-1) \times 100$) (Rasmussen, 2001; Fey et al., 2004) différentes entre les deux méthodes : 73.68%, 95.56% et 107.90% pour les marqueurs MGgumD1, XAC-3780 et XAC-3776 respectivement en qPCR, et 91.85%, 141.79% et 102.26% pour ces mêmes marqueurs respectivement en qRTPCR. Une efficacité d'amplification correcte se situant entre 95% et 105%, c'est le marqueur XAC-3780 qui fournit la meilleure efficacité en qPCR et le marqueur XAC-3776 en qRTPCR. Ces résultats montrent globalement des meilleures corrélation, sensibilité et efficacité avec l'outil de qPCR comparé à l'outil de qRTPCR.

2.3. Comparaison des concentrations bactériennes déterminées par qRTPCR et par dénombrement sur milieu de culture

A noter que les amplifications *in vitro* ne sont réalisées que sur les échantillons provenant du milieu minimum (XVM2) et sur trois des quatre répétitions.

La concentration bactérienne est évaluée périodiquement *in vitro* pendant toute la phase de croissance jusqu'à 40 heures, à la fois par qRTPCR et par la méthode de dénombrement bactérien sur milieu de culture, en utilisant une concentration de départ de 10^4 CFU.mL⁻¹ (Figure 12). Les résultats bruts obtenus pour chaque répétition figurent en Annexe 17. Les concentrations obtenues par qRTPCR sont calculées en utilisant les résultats des courbes de gamme étalon obtenus précédemment (Figure 11). Globalement, les concentrations bactériennes obtenues par qRTPCR sont inférieures à celles obtenues par dénombrement au

Tableau 2. Récapitulatif des résultats de qRTPCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) de suspensions bactériennes à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹ de la souche IAPAR 306 de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) traitées à +80°C pendant trois heures.

Fragment d'ARNm ^a	Absence / Présence / Indéterminé (- / + / x)
MG-gumD1	-
MG-gumD2	+
XAC-0257	x
XAC-2685	+
XAC-2763	x
XAC-3745	+
XAC-3749	+
XAC-3774	x
XAC-3776	-
XAC-3780	-
XAC-3781	x
XAC-3791	x

^a : les paires d'amorces utilisées (gènes cibles) sont : MG-gumD1F/ MG-gumD1R (*gumD1*), MG-gumD2F/ MG-gumD2R (*gumD2*), XAC-0257F/ XAC-0257R, XAC-2685F/ XAC-2685R, XAC-2763F/ XAC-2763R, XAC-3745F/ XAC-3745R, XAC-3749F/ XAC-3749R, XAC-3774F/ XAC-3774R, XAC-3776F/ XAC-3776R, XAC-3780F/ XAC-3780R, XAC-3781F/ XAC-3781R et XAC-3791F/ XAC-3791R.

tout début de la cinétique, et sont largement supérieures en fin de cinétique. Les écarts-types obtenus en qRT-PCR sont très élevés, ce qui reflète des données non homogènes en qRT-PCR (i.e. des écarts élevés entre les différentes répétitions). Dans l'ensemble, les concentrations bactériennes obtenues par qRT-PCR ne suivent pas la même tendance que les concentrations obtenues par dénombrement sur milieu de culture ; avec des concentrations très élevées et non attendues pour la qRT-PCR (par exemple, concentrations supérieures à 10^{15} CFU.mL⁻¹ avec le marqueur XAC-3776 pour la souche JJ238.17).

La concentration bactérienne obtenue par l'outil de qRT-PCR (axe des y) est comparée à celle obtenue par dénombrement sur milieu de culture (axe des x) (Figure 13). Les concentrations bactériennes obtenues par dénombrement sur milieu de culture varient entre 10^4 et 10^9 CFU.mL⁻¹. Les concentrations bactériennes obtenues par qRT-PCR varient environ entre 10^0 et 10^{20} CFU.mL⁻¹ pour les trois marqueurs. Les deux méthodes ne sont pas corrélées pour ces trois marqueurs ($0.071 < R^2 < 0.636$). Ces résultats suggèrent que la qRT-PCR, avec comme cible l'ARNm ici, n'est pas adaptée pour quantifier de façon sensible les bactéries viables de nos échantillons de *Xcc*.

2.4. Comparaison des concentrations bactériennes déterminées par qPCR et par dénombrement sur milieu de culture

La concentration bactérienne est évaluée périodiquement *in vitro* pendant toute la phase de croissance jusqu'à 40 heures, à la fois par qPCR et par la méthode de dénombrement bactérien sur milieu de culture, en utilisant une concentration de départ de 10^4 CFU.mL⁻¹ (Figure 14). Les résultats bruts obtenus pour chaque répétition figurent en Annexe 18. Les concentrations obtenues par qPCR sont calculées en utilisant les résultats des courbes de gamme étalon obtenus précédemment (Figure 11). Les concentrations bactériennes obtenues par qPCR sont dans l'ensemble inférieures à celles obtenues par dénombrement au début de la cinétique, et sont supérieures en fin de cinétique. Globalement, les concentrations bactériennes obtenues par qPCR semblent être corrélées avec les concentrations obtenues par dénombrement sur milieu de culture (écarts-types des concentrations obtenues par qPCR assez faibles).

La concentration bactérienne obtenue par l'outil de qPCR (axe des y) est comparée à celle obtenue par dénombrement sur boîte de culture (axe des x) (Figure 15). Les concentrations bactériennes obtenues par dénombrement sur milieu de culture varient entre 10^4 et 10^9 CFU.mL⁻¹. Les concentrations bactériennes obtenues par la qPCR varient environ entre 10^0 et 10^{12} CFU.mL⁻¹ pour les marqueurs XAC-3376 et XAC-3780, et entre 10^4 et 10^9 CFU.mL⁻¹ pour MGgumD1. Globalement, pour les marqueurs XAC-3376 et XAC-3780, la méthode de qPCR sous-estime les faibles concentrations (points en dessous de la bissectrice) et surestime les fortes concentrations (points au dessus de la bissectrice). A noter que le nombre de points représentatifs du marqueur MGgumD1 (pour les trois souches) est bien inférieur à ceux représentatifs des marqueurs XAC-3776 ou XAC-3780. Pour les concentrations détectées à plus de 10^9 CFU.mL⁻¹, il s'agirait probablement de bactéries mortes détectées par la qPCR. Les deux méthodes sont bien corrélées pour les

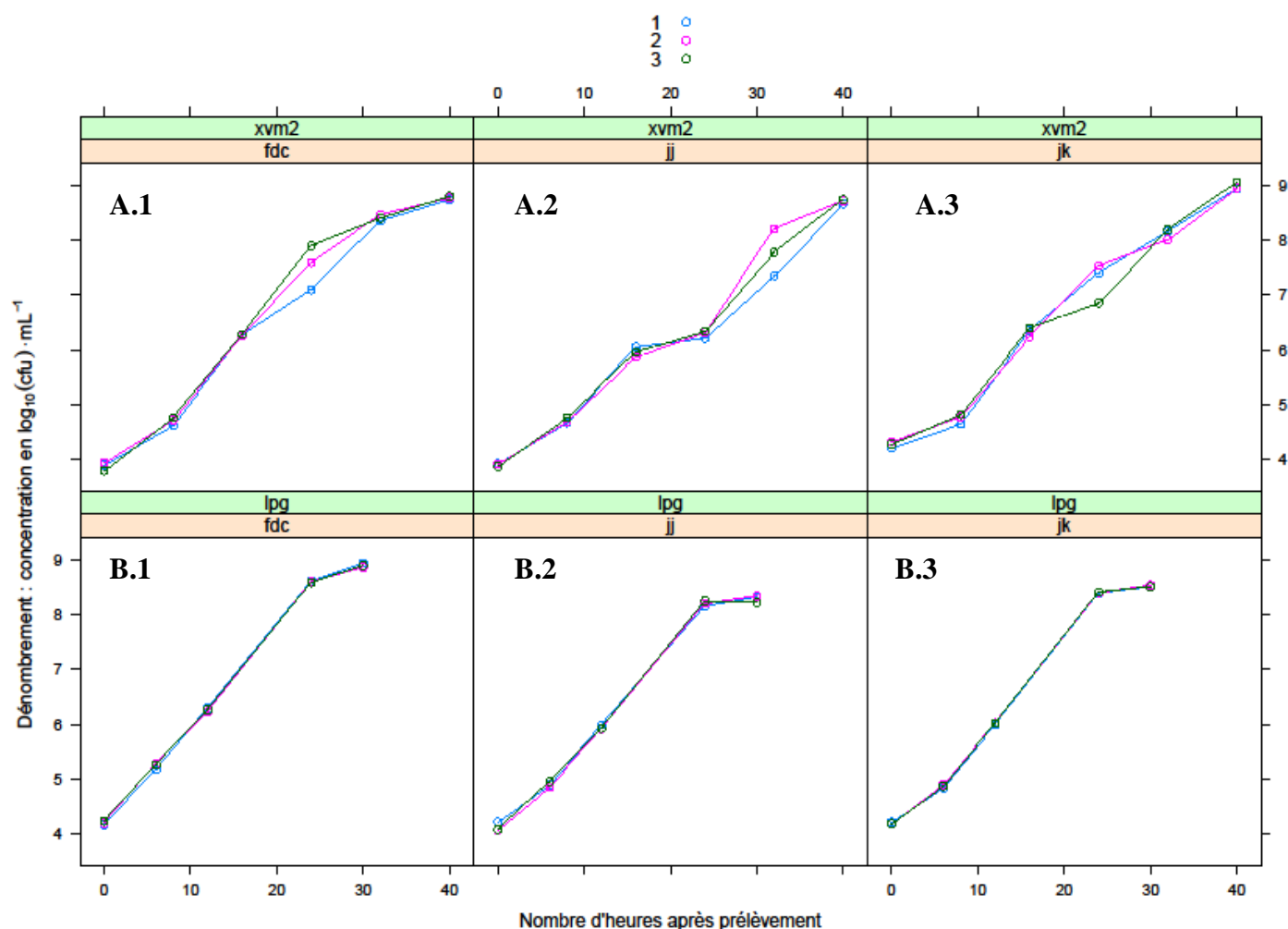


Figure 10. Cinétiques de croissance bactérienne sur milieu minimum XVM2 (A) et milieu riche LPG (B) pour les trois souches bactériennes de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), IAPAR 306 (1), JJ238.17 (2) et JK4.1 (3). Les courbes bleues, roses et vertes représentent respectivement les répétitions 1, 2 et 3. La concentration bactérienne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtenue par dénombrement sur milieu de culture figure en ordonnées. Le nombre d'heures après le premier prélèvement figure en abscisses (prélèvement toutes les huit heures pour XVM2 et toutes les six heures pour LPG).

marqueurs XAC-3776 ($0.883 < R^2 < 0.959$; $1.702 < \text{pente} < 1.784$) et XAC-3780 ($0.884 < R^2 < 0.903$; $1.707 < \text{pente} < 1.803$) ; elles le sont moins pour le marqueur MGgumD1 ($0.828 < R^2 < 0.865$; $1.042 < \text{pente} < 1.430$). Ces résultats suggèrent que la qPCR est adaptée pour déterminer de façon sensible (avec les marqueurs XAC-3776 et XAC-3780) les concentrations bactériennes de nos échantillons de *Xcc*, à partir d'un seuil de détection de 10^2 CFU.mL⁻¹.

3. Mesure de la cinétique bactérienne *in planta*

Au vu des résultats obtenus en qRT-PCR pour la cinétique de croissance bactérienne *in vitro*, les amplifications ne sont réalisées qu'en qPCR. A noter que le dernier temps de prélèvement, i.e. J+22, n'a pas pu être intégré dans cette étude.

3.1. Comparaison des concentrations bactériennes *in planta* déterminées par qPCR et par dénombrement sur milieu de culture

La concentration bactérienne est évaluée périodiquement *in planta* pendant la phase de croissance jusqu'à 14 jours, à la fois par qPCR et par la méthode de dénombrement bactérien sur milieu de culture, en utilisant une concentration de départ de 10^3 CFU.mL⁻¹ (Figure 16). Les concentrations obtenues par qPCR sont calculées en utilisant les résultats des courbes de gamme étalon obtenus précédemment (Figure 11). Les résultats bruts obtenus pour chaque répétition figurent en Annexe 19 et en Annexe 20. Globalement, les concentrations bactériennes obtenues par qPCR sont supérieures à celles obtenues par dénombrement. Les écarts-types obtenus en qPCR restent faibles, ce qui reflète des données homogènes en qPCR (i.e. des écarts très faibles entre les différentes répétitions). Les concentrations bactériennes obtenues par qPCR suivent de très près la tendance des concentrations obtenues par dénombrement sur milieu de culture.

La concentration bactérienne obtenue par l'outil de qPCR (axe des y) est comparée à celle obtenue par dénombrement sur milieu de culture (axe des x) (Figure 17). Les concentrations bactériennes obtenues par dénombrement sur milieu de culture varient entre 10^3 et 10^7 CFU.mL⁻¹. Les concentrations bactériennes obtenues par la qPCR varient environ entre 10^3 et 10^8 CFU.mL⁻¹ pour les deux marqueurs XAC-3376 et XAC-3780. A noter qu'ici, la méthode de dénombrement sur milieu a tendance à sous-estimer les concentrations (points en dessous de la bissectrice). Les deux méthodes sont bien corrélées pour ces deux marqueurs ($R^2 = 0.905$, pente = 1.388 pour XAC-3776 ; $R^2 = 0.927$, pente = 1.372 pour XAC-3780), qui sont donc équivalents en termes de détection des bactéries. Ces résultats suggèrent que la qPCR est adaptée pour détecter la concentration bactérienne de *Xcc in planta* à partir d'un seuil de détection de 10^3 CFU.mL⁻¹.

IV. DISCUSSION

Deux outils moléculaires ont été développés dans cette étude, la qPCR (ciblant l'ADN) et la qRT-PCR (ciblant l'ARNm), dans le but d'avoir des outils appropriés capables de mesurer de façon spécifique, sensible et pratique la multiplication *in planta* de souches invasives de *Xcc* appartenant au pathotype A.

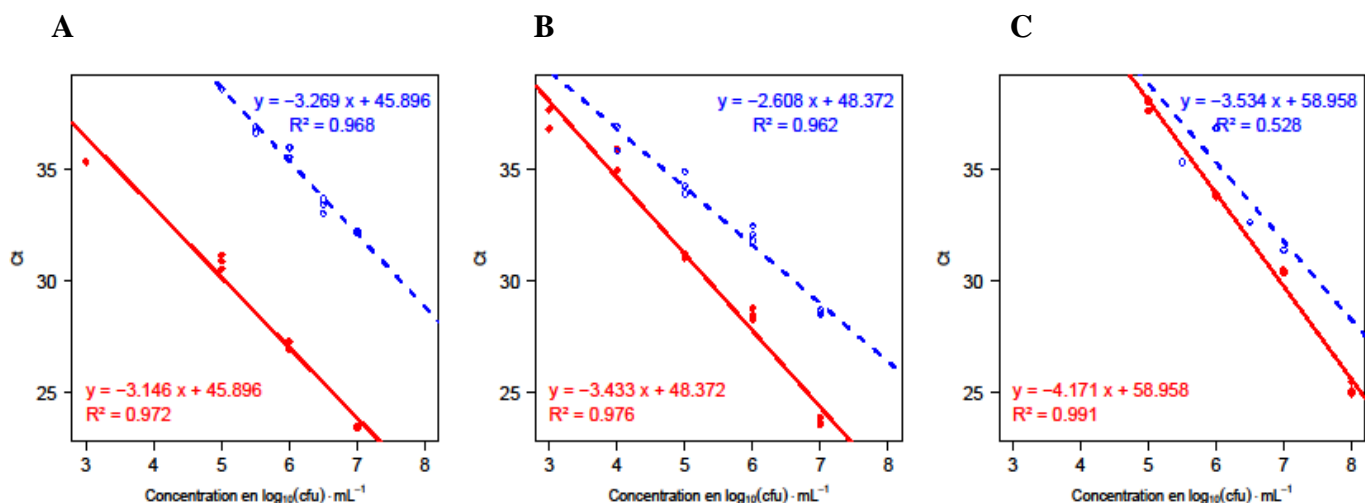


Figure 11. Quantification bactérienne par qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) et qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) chez la souche de référence IAPAR 306 de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*). Des séries de dilution intermédiaires sont réalisées sur l'ADN et l'ARN de 10^3 à 10^8 CFU.mL⁻¹ et évaluées en qPCR (en rouge) et en qRT-PCR (en bleu) avec les trois marqueurs XAC-3776 (A), XAC-3780 (B) et MG-gumD1 (C). Les valeurs de Ct figurent en ordonnées. La concentration bactérienne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre (CFU.mL⁻¹) figure en abscisses. Les droites représentent les droites de régression.

Les deux techniques moléculaires ont été évaluées sur des cinétiques de croissance *in vitro* et *in planta* en parallèle avec une méthode conventionnelle de dénombrement sur milieu de culture, afin de comparer les différentes méthodes entre elles (méthode moléculaire *versus* méthode microbiologique). Des marqueurs de viabilité (i.e. reflétant la viabilité des cellules bactériennes en qRTPCR), possédant (i) un taux de transcription stable entre différents états des bactéries de *Xcc* (milieu *in vitro* et milieu mimant les conditions de la plante) et (ii) des mismatches permettant de différencier les différents sous-groupes intrapathotypes de *Xcc*, ont été triés *in vitro* par des expérimentations de traitement à la chaleur dans le but de ne détecter que les cellules viables de *Xcc*.

Les résultats obtenus pour l'expérimentation de viabilité se rapprochent de ceux obtenus par Golmohammadi et al. (2012). Dans cette étude, il y a trois catégories d'ARNm : (i) les ARNm détectés de la même manière dans les suspensions des cellules bactériennes viables et non viables, (ii) les ARNm pour lesquels ils obtiennent des valeurs de Ct significativement plus élevées dans les suspensions de bactéries vivantes *versus* mortes, et (iii) le marqueur MG-gumD1 (445 pb) qui est le seul à montrer une réponse « tout ou rien » à partir des bactéries vivantes *versus* mortes. Comme ces auteurs, après optimisation de la méthode : (i) les ARNm de certains gènes ont été détectés à la fois dans les suspensions des cellules bactériennes viables et non viables. (ii) Le marqueur MG-gumD1 (445 pb) est un parfait marqueur de viabilité puisqu'il n'est pas du tout amplifié à partir de cellules bactériennes inactivées par la chaleur. (iii) Les deux marqueurs, XAC-3776 (56 pb) et XAC-3780 (48 pb) sont dans le cas intermédiaire où des Ct significativement plus élevés sont détectés dans les suspensions de bactéries mortes. Ces résultats montrent qu'une détection par qRTPCR n'est pas toujours appropriée pour évaluer la viabilité de *Xcc*, comme cela a déjà été montré pour d'autres modèles bactériens (Josephson et al., 1993; Sheridan et al., 1998; Birch et al., 2001), et que finalement les ARN peuvent se montrer stables dans certaines conditions. Plusieurs facteurs peuvent affecter la stabilité des ARNm, le principal étant la taille du fragment d'ARNm. Plus le fragment est long, plus il est susceptible d'être affecté par les ribonucléases, comme il a été montré ici pour le fragment de 445 pb de MG-gumD1. Les marqueurs XAC-3776 (56 pb) et XAC-3780 (48 pb) sont relativement de bons marqueurs de viabilité au vue des différences significatives de Ct obtenues entre les cellules traitées et non traitées. MGgumD1 et ces deux marqueurs ont ensuite été utilisés pour une comparaison relative de la croissance *in vitro* et *in planta* entre trois souches de *Xcc*.

Les trois méthodes utilisées dans cette étude présentent chacune leurs avantages et inconvénients. La méthode de dénombrement sur milieu de culture est une méthode très simple, et utilisée depuis plus d'un siècle en Microbiologie pour déterminer en routine les concentrations de bactéries viables (Matsuda et al., 2006). Cependant, cette méthode (i) conduit souvent à une sous-estimation de la population bactérienne ciblée (croissance inhibée par des bactéries saprophytes, etc.), (ii) est très lente (une croissance d'environ trois jours à l'étuve à 28°C chez *Xcc*) (Nadkarni et al., 2002) comparée aux nouvelles méthodes

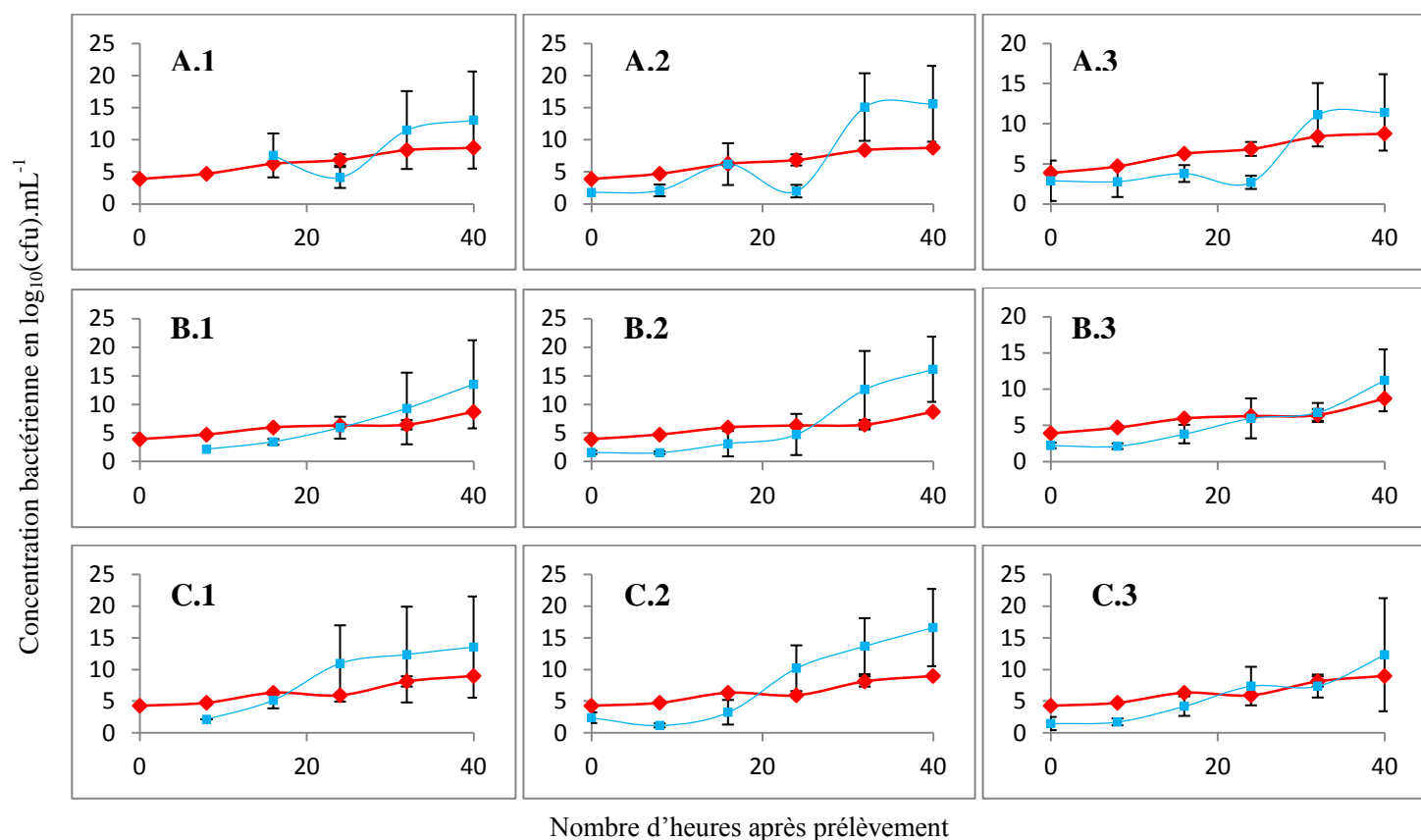


Figure 12. Cinétiques de croissance bactérienne sur milieu minimum (XVM2) déterminée par qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) (en bleu) et par dénombrement sur milieu de culture (en rouge) pour les trois souches bactériennes de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), IAPAR 306 (1), JJ238.17 (2) et JK4.1 (3) avec les trois marqueurs MG-gumD1 (A), XAC-3780 (B) et XAC-3776 (C). La concentration bactérienne moyenne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre (CFU.mL⁻¹) obtenue figure en ordonnées. Le nombre d'heures après le premier prélèvement figure en abscisses (prélèvement toutes les huit heures pour ce milieu). Les barres d'erreurs représentent les écart-types.

moléculaires, et (iii) ne prend pas en compte les bactéries en état Viable mais Non Cultivable (VNC) (Golmohammadi et al., 2013). La qPCR est un outil classique et simple d'utilisation, et a beaucoup été utilisée depuis ces dix dernières années dans des études de microbiologie environnementale, humaine et végétale (Josephson et al., 1993; Keer and Birch, 2003; Pitkänen et al., 2013). De plus, elle détecte les bactéries en VNC. Cependant, l'utilisation de cette méthode se heurte de plus en plus à de nombreuses critiques car l'ADN est associé aux cellules mortes ; et par conséquent, la qPCR est incapable de différencier les bactéries viables des mortes. La qRTPCR, ciblant spécifiquement l'ARNm, est une méthode précise de plus en plus utilisée, qui s'est avérée capable de ne détecter que les bactéries viables (Golmohammadi et al., 2012). Cependant, elle ne détecte pas les bactéries en VNC. De plus, l'une des contraintes de cette méthode réside dans la préparation et l'extraction des ARNm. Ces derniers se trouvent en petites quantités et sont facilement dégradables par les ribonucléases du milieu, et facilement contaminés par l'ADN. Après une à deux semaines stockées à -80°C , les ARNm deviennent parfois difficilement détectables. De nombreuses précautions doivent être ainsi prises pour l'extraction des ARNm et la qRTPCR.

La sensibilité de la méthode de qPCR s'est avérée être 16 à 256 fois supérieure à celle de la qRTPCR, *in vitro*. De plus, les efficacités d'amplification se sont avérées meilleures aussi en qPCR comparées à celles en qRTPCR. Ces résultats sont inattendus car, contrairement à la qPCR, la qRTPCR permettrait de suivre en même temps plusieurs transcrits d'ARNm (et étant donné que les transcrits d'ARNm sont naturellement amplifiés dans les cellules vivantes). En effet, plusieurs études utilisant la qRTPCR dans le but de détecter des bactéries vivantes ont montré qu'elle était plus sensible que la qPCR (Matsuda et al., 2006). La limite de détection de la qPCR est ainsi aux alentours de 10^2 - 10^3 CFU.mL⁻¹, alors qu'elle est de 10^5 en qRTPCR ; la limite de détection de la qPCR semblerait être suffisante pour une quantification juste de *Xcc*. La faible sensibilité trouvée en qRTPCR pourrait avoir plusieurs explications, dont (i) la dégradation partielle de l'ARN après extraction malgré les précautions prises pour le protéger (inhibiteurs de RNases), ou encore (ii) un manque d'optimisation de la méthode.

Il y a très peu de congruence pour la concentration bactérienne entre la méthode de qRTPCR et la méthode de dénombrement sur milieu de culture (*in vitro*). En effet, il semble que, pour les différents marqueurs étudiés, il y ait des variations dans les niveaux de transcription avec des pics de surexpression (notamment en stade tardif) ou bien de répression de la transcription au cours du temps. Cela montre que même si les marqueurs ont été sélectionnés sur la base d'une transcription stable dans deux conditions biologiques différentes (milieu minimum et milieu mimant les conditions *in planta*), cette transcription n'est pas stable au cours du temps et peut varier en fonction des différentes phases de croissance bactériennes. Des études similaires réalisées chez *Escherichia Coli*, ciblant l'ARN ribosomique 16S, ont montré qu'à l'inverse, la quantification de cet ARN était corrélée aux CFU obtenus par dénombrement, et cela de la phase exponentielle à la phase stationnaire ; ce qui fait de la qRTPCR dans cette étude un outil fiable de

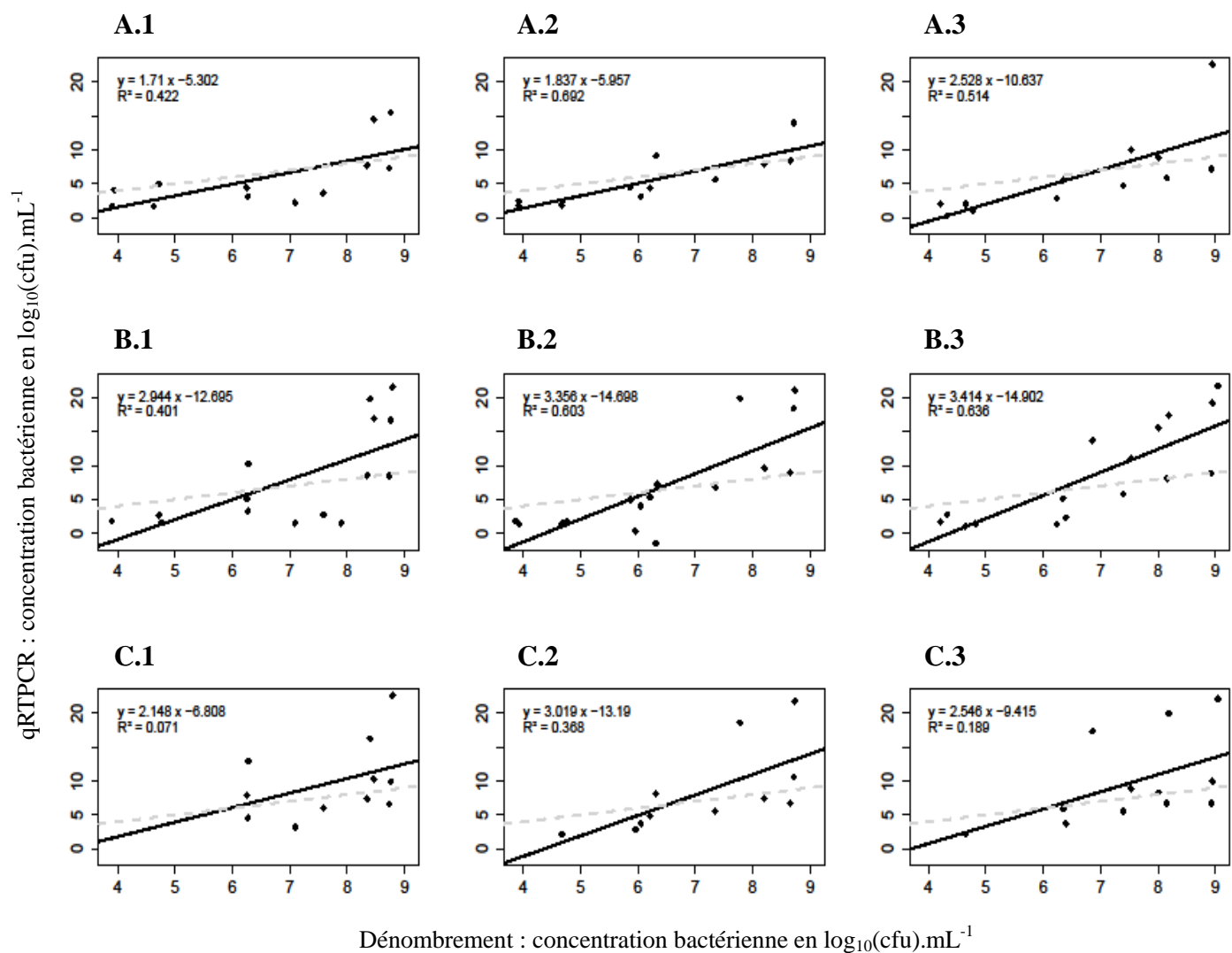


Figure 13. Comparaison des concentrations bactériennes déterminées par qRT-PCR (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*) et par dénombrement sur milieu de culture pour les trois souches bactériennes de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), IAPAR 306 (1), JJ238.17 (2) et JK4.1 (3) avec les marqueurs XAC-3776 (A), XAC-3780 (B) et MG-gumD1 (C). La concentration bactérienne (en logarithme d'unité formant colonie par millilitre ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)) obtenue par qRT-PCR figure en ordonnées, et la concentration bactérienne obtenue par dénombrement sur milieu de culture figure en abscisses. Les droites grises (en pointillées) représentent les bissectrices, et les droites noires (traits pleins) représentent les droites de régression.

quantification de la bactérie (Matsuda et al., 2006). L'ARN 16S n'a pas été choisi dans notre étude, à la fois pour son manque de spécificité, et également car aucun mismatch n'a pu être identifié dans la séquence du gène pour différencier les deux sous groupes DCPA1 et 2. Les résultats obtenus dans notre étude suggèrent que la méthode de qRTPCR n'est pas appropriée pour quantifier de façon fiable les souches de *Xcc* étudiées ici. A l'inverse, il existe une bonne corrélation entre les concentrations bactériennes obtenues entre la méthode de qPCR et la méthode de dénombrement sur milieu de culture, à la fois *in vitro* et *in planta*. Cependant, *in vitro* la qPCR aurait parfois tendance à sous-estimer les faibles concentrations ou surestimer les fortes concentrations, alors qu'*in planta* c'est la méthode de dénombrement qui aurait tendance à sous-estimer les concentrations en début de cinétique. Mais globalement, les deux marqueurs candidats XAC-3776 et XAC-3780 semblent être ainsi bien appropriés en qPCR pour évaluer quantitativement (et plus rapidement que la méthode de dénombrement) les souches de *Xcc* étudiées ici.

Xcc ainsi que son hôte (le genre *Citrus*) sont tous deux originaires d'Asie (Civerolo, 1984; Ollitrault and Navarro, 2012). Jusqu'au XIX^{ème} siècle, tous deux n'étaient cantonnés qu'en Asie. Cependant, l'expansion géographique du pathogène hors de l'Asie a été signalée au début du XX^{ème} siècle (Hasse, 1915; Doidge, 1929; Rossetti, 1977; Skaria and Da Grac, 2012). Depuis ces dernières décennies, la mondialisation a multiplié de façon drastique les mouvements internationaux des plantes ainsi que leurs outils, à travers les voyages humains et le commerce. Par conséquent, l'introduction d'organismes nuisibles et de pathogènes dans l'agriculture se produit de plus en plus, en termes de fréquence et de variabilité d'origine géographique (Hulme, 2009). La récente introduction de *Xcc* dans plusieurs pays africains où le CAA n'avait jamais été observé auparavant est un exemple frappant des migrations conduisant aux émergences de maladies (Traoré et al., 2008; Derso et al., 2009). Récemment, il a été montré que le pathotype A de *Xcc* est divisé en deux sous-groupes génétiques distincts (DAPC 1 et 2) (Pruvost et al., 2014). Cette découverte est confortée par des analyses de SNPs (Gordon et al., *in prep*) (cf figure 1). Remarquablement, seules les souches du sous-groupe DAPC 1.1 (pathotype A) possèdent une très grande étendue géographique et sont observées dans presque toutes les régions du monde où le CAA s'est établi (Asie de l'Est, région de l'Océan Indien, Amérique du Sud, Floride, etc.). Ces résultats suggèrent que ces souches du DAPC 1.1 sont à l'origine de l'expansion géographique de *Xcc* durant le XX^{ème} siècle (Pruvost et al., 2014). Ces résultats suggèrent également des événements récents de migration à longue distance de *Xcc*. Désormais, des cas d'émergence sont constatés dans les quatre sous-groupes (par exemple le DAPC 4 : Derso et al., 2009). Cette nouvelle vague d'émergence aurait ainsi émergé à partir du groupe DAPC 1.1 (Pruvost et al., 2014). Très récemment, des souches appartenant au sous-groupe DAPC 2 et potentiellement pathogènes ont émergé au Mali et au Sénégal (Leduc, non publié). Les souches des deux sous-groupes DAPC 1 et 2 pourraient ainsi être caractérisées par les deux marqueurs trouvés dans cette étude (XAC-3776 et XAC 3780), puisque ces derniers sont porteurs de mutations ponctuelles (mismatch) exploitables en Taqman.

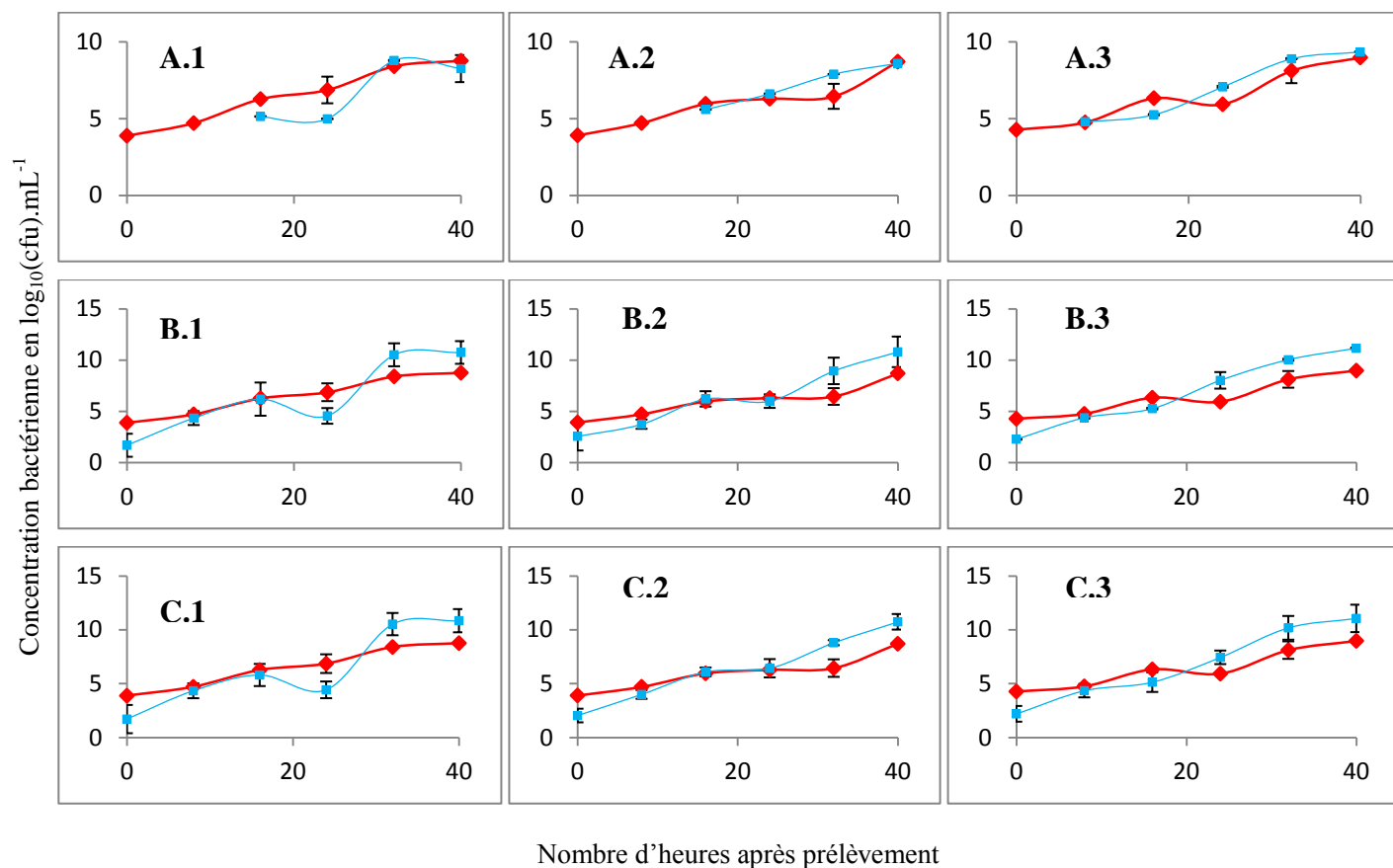


Figure 14. Cinétiques de croissance bactérienne sur milieu minimum (XVM2) déterminée par qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) (en bleu) et par dénombrement sur milieu de culture (en rouge) pour les trois souches bactériennes de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), IAPAR 306 (1), JJ238.17 (2) et JK4.1 (3) avec les trois marqueurs MG-gumD1 (A), XAC-3780 (B) et XAC-3776 (C). La concentration bactérienne moyenne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) figure en ordonnées. Le nombre d'heures après le premier prélèvement figure en abscisses (prélèvement toutes les huit heures pour ce milieu). Les barres d'erreurs représentent les écart-types.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La meilleure alternative à la méthode microbiologique trouvée dans cette étude est la qPCR. L'intérêt majeur de cette méthode est la possibilité de réaliser des co-inoculations (i.e. co-infections de différentes souches de *Xcc*). Ces différentes souches issues de co-inoculations pourraient être amplifiées en technologie Taqman grâce aux deux marqueurs XAC-3776 et XAC-3780, porteurs de mutations ponctuelles (mismatch). Ces mutations sont exploitables en Taqman pour amplifier de façon discriminante les souches des deux sous-groupes intrapathotypes de *Xcc*, DAPC 1 et 2. Les expériences représentent une stratégie très informative dans l'évaluation du fitness de souches bactériennes. En effet, *in planta*, la variabilité intra-souche du pouvoir pathogène mesurée sur plusieurs plantes est trop grande pour pouvoir comparer de façon convenable le pouvoir pathogène inter-souches. L'intérêt des co-inoculations pour la mesure du fitness réside principalement dans la suppression de ce biais, car les différentes souches se trouvent dans les mêmes conditions dès le départ. Un autre intérêt de la qPCR par rapport à la méthode classique de dénombrement est le gain de temps puisqu'il faut trois à cinq heures seulement pour la quantification bactérienne par la méthode de qPCR alors qu'il faut trois jours pour la méthode microbiologique.

Par contre, l'inconvénient principal de la qPCR réside dans l'absence de différenciation entre les bactéries viables et non viables. Une alternative à ce problème pourrait être l'utilisation de la cytométrie de flux, qui est une technique de mesure et de comptage de petites particules dans un courant fluide où chaque particule est excitée par une source de lumière (D'Hondt *et al.* 2011). La première application de la cytométrie de flux en phytopathologie remonte aux années 1990. La cytométrie de flux peut être appliquée en phytopathologie pour l'évaluation du statut physiologique de bactéries qui se fait ainsi à travers leur viabilité et l'expression de leurs gènes (D'Hondt *et al.* 2011). La cytométrie de flux permettrait de caractériser ici : (i) quantitativement les bactéries par comptage au passage d'un laser, et (ii) qualitativement les bactéries, i.e. en détectant les bactéries vivantes et mortes de *Xcc*, ou encore les souches appartenant ou non au genre *Xanthomonas*. Cette méthode pourrait être testée en parallèle de la qPCR. Cette méthodologie, i.e. la qPCR couplée à la cytométrie de flux, pourrait ensuite être appliquée à un système-modèle, comprenant : (i) une souche de référence de *Xcc* (IAPAR306 appartenant au sous-groupe DAPC 1) et (ii) un mutant de cette souche chez lequel le TAL majeur *pthA4* est délété, ce qui altère l'aptitude à la multiplication *in planta* de *Xcc* (Swarup *et al.*, 1991). Ce système modèle, pour lequel il y a une différence nette de multiplication *in planta* entre deux souches (i.e. densité bactérienne *in planta* et relargage d'inoculum moindres pour le mutant) permettra de valider les outils mis au point.

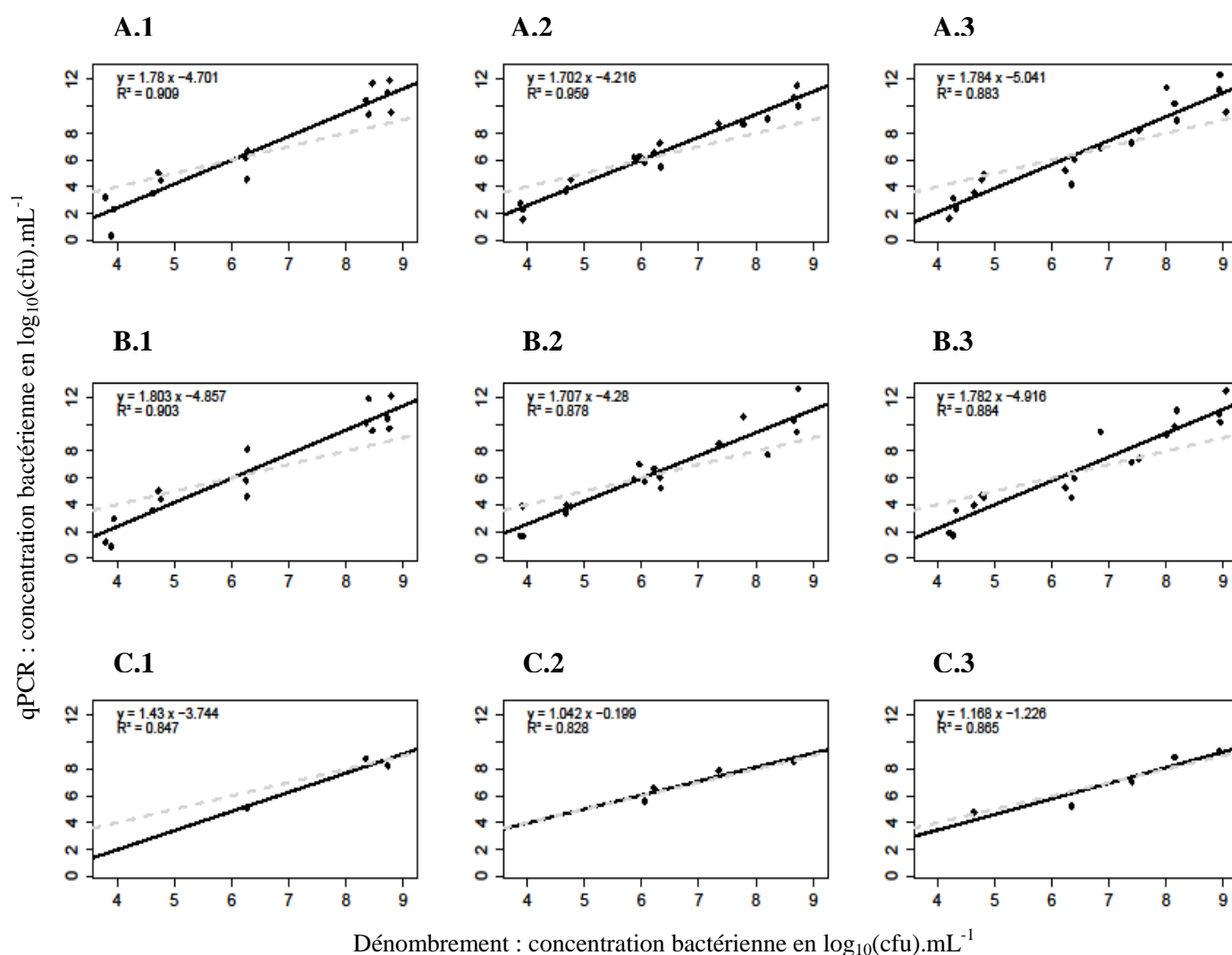


Figure 15. Comparaison des concentrations bactériennes déterminées par qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) et par dénombrement sur milieu de culture pour les trois souches bactériennes de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), IAPAR 306 (1), JJ238.17 (2) et JK4.1 (3) avec les marqueurs XAC-3776 (A), XAC-3780 (B) et MG-gumD1 (C). La concentration bactérienne (en logarithme d'unité formant colonie par millilitre (CFU.mL⁻¹)) obtenue par qPCR figure en ordonnées, et la concentration bactérienne obtenue par dénombrement sur milieu de culture figure en abscisses. Les droites grises (en pointillées) représentent les bissectrices, et les droites noires (traits pleins) représentent les droites de régression.

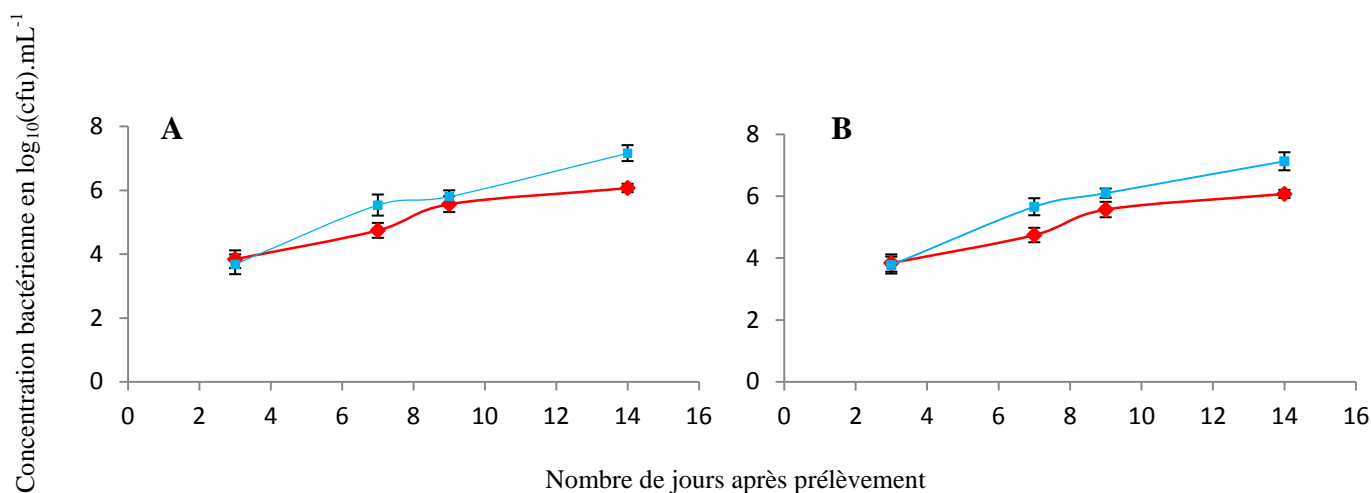


Figure 16. Cinétiques de croissance bactérienne *in planta* sur le limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*) déterminée par qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) (en bleu) et par dénombrement sur milieu de culture (en rouge) pour la souche bactérienne de référence IAPAR 306 de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), avec les marqueurs XAC-3776 (A) et XAC-3780 (B). La concentration bactérienne moyenne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) figure en ordonnées. Le nombre de jours après infiltration sur feuilles figure en abscisses.

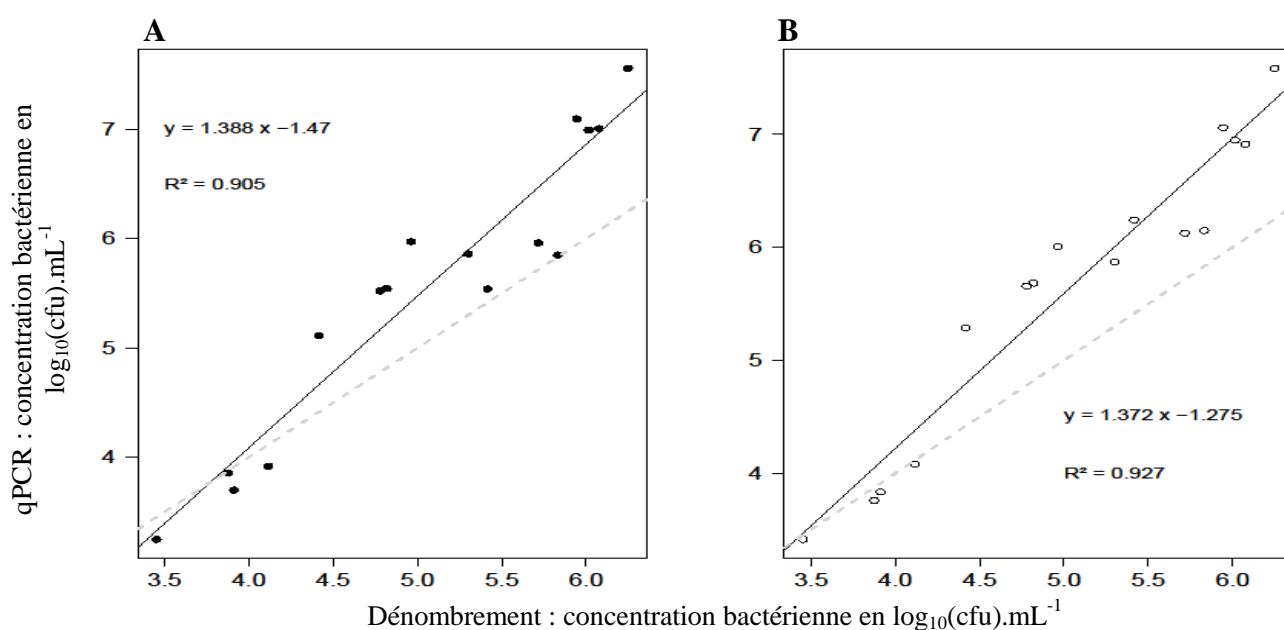


Figure 17. Comparaison des concentrations bactériennes *in planta* sur le limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*) déterminées par qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) et par dénombrement sur milieu de culture pour la souche bactérienne de référence IAPAR 306 de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), avec les marqueurs XAC-3776 (A) et XAC-3780 (B). La concentration bactérienne (en logarithme d'unité formant colonie par millilitre ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)) obtenue par qPCR figure en ordonnées, et la concentration bactérienne obtenue par dénombrement sur milieu de culture figure en abscisses. Les droites grises (en pointillées) représentent les bissectrices, et les droites noires (traits pleins) représentent les droites de régression.

Références bibliographiques

- Achtman, M., 1997. Microevolution and epidemic spread of serogroup A *Neisseria meningitidis* - a review. *Gene*. 192, 135-140.
- Achtman, M., 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 53-70.
- Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P.A.D., Brisse, S., Nesme, X., Chiroleu, F., Bui Thi Ngoc, L., Jouen, E., Lefeuvre, P., Vernière, C., Pruvost, O., 2009. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to *Anacardiaceae* and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 306-318.
- Albuquerque, P., Nicola, A.M., Nieves, E., Paes, H.C., Williamson, P.R., Silva-Pereira, I., Casadevall, A., 2014. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*. 5. doi:10.1128/mBio.00986-13 <http://mbio.asm.org/content/5/1/e00986-13.full.pdf+html>
- Ameziane N., Bogard M., Lamoril J., 2006. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier. 705 pages.
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., Daszak, P., 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19, 535-544.
- Andersson, D.I., Levin, B.R., 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 489-493.
- Atwood, K.C., Schneider, L.K., Ryan, F.J., 1951. Periodic selection in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*. 37, 146-155.
- Barbarin, G., 2013. Mise au point d'une méthode de mesure de fitness *in planta* sur *Xanthomonas citri* pv. *citri*, responsable du chancre Asiatique des agrumes. Rapport de stage de Master 1, Université de La Réunion.

- Birch, L., Dawson, C.E., Cornett, J.H., Keer, J.T., 2001. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Letters in Applied Microbiology*. 33, 296-301.
- Blanc, D.S., 2004. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect. Genet. Evol.* 4, 193-197.
- Boch, J., Bonas, U., 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 419-436.
- Boscariol, R.L., Monteiro, M., Takahashi, E.K., Chabregas, S.M., Vieira, M.L.C., Vieira, L. G.E., Pereira, L.F.P., Mourao Filho, F.D.A.A., Cardoso, S.C., Christiano, R.S.C., Bergamin Filho, A., Barbosa, J.M., Azevedo, F.A., Mendes, B.M.J., 2006. *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* "Hamlin". *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 131, 530-536.
- Bradbury, JF., 1986. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Oxford University Press, Oxford.
- Brunings, A.M., Gabriel, D.W., 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4, 141-157.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jarne, P., Brisse, S., Guérin, F., Boutry, S., Gagnevin, L., Pruvost, O., 2009a. From local surveys to global surveillance: three high-throughput genotyping methods for epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1173-1184.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Vital, K., Guérin, F., Gagnevin, L., Brisse, S., Ah-You, N., Pruvost, O., 2009b. Development of fourteen minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *Mol. Ecol. Res.* 9, 125-127.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin, L., Pruvost, O., 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 515-525.

- Büttner, D., He, S.Y., 2009. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 150, 1656-1664.
- Bull, C.T., De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Saux, M.F.L., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E., Takikawa, Y., 2012. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). *J. Plant Pathol.* 94, 21-27.
- Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J., Kim, J.G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Anthony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., Frommer, W.B., 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature.* 468, 527-532.
- Civerolo, E.L., 1984. Bacterial canker disease of *citrus* [*Xanthomonas campestris*]. *J. Rio Grand. Val. Hort. Soc.* 37, 127-145.
- Cooper, J.E., Feil, E.J., 2004. Multilocus sequence typing -what is resolved? *Trends Microbiol.* 12, 373-377.
- Cornelis, G.R., 2006. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 811-825.
- Da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M.C., Do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E.A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M.B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J.S., Ferreira, R.C.C., Ferro, M.I.T., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M.B.N., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F.M., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T.M., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A.D., Silva, C., De Souza, R.F., Spinola, L.A.F., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I.D., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., Kitajima, J.P., 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature.* 417, 459-463.
- Das, A., Rangaraj, N., Sonti, R.V., 2009. Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv.

oryzae are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. Mol. Plant-Microbe Interact. 22, 73-85.

Denny, T.P., 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species, in: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Plant-Associated Bacteria. Springer Publishing, Dordrecht, pp. 573-644.

Derso, E., Vernière, C., Pruvost, O., 2009. First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri*-A* causing citrus canker on lime in Ethiopia. Plant Disease. 93.

Desprez-Loustau, M.L., Robin, C., Buée, M., Courtecuisse, R., Garbaye, J., Suffert, F., Sache, I., Rizzo, D.M., 2007. The fungal dimension of biological invasions. Trends Ecol. Evol. 22, 472-480.

D'Hondt, L., Höfte, M., Van Bockstaele, E. & Leus, L., 2011. Applications of flow cytometry in plant pathology for genome size determination, detection and physiological status. Molecular Plant Pathology, 12, 815-828.

Doidge, E.M., 1929. Further citrus canker studies. Union S Africa Dept Agric Bull. 51, 1-29.

Dye, D.W., 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. New Z. J. Sci. 5, 393-416.

Dye, D.W., Bradbury, J.F., Goto, M., Hayward, A.C., Lelliott, R.A., Schroth, M.N., 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Rev. Plant Pathol. 59, 153-168.

Eisen, J.A., 2000. Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 606-611.

Ellegren, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature reviews. Genetics. 5, 435-445.

Escalon, A., 2013. Evolution et spécialisation du pouvoir pathogène de *Xanthomonas citri* pv. *citri* : rôle des effecteurs de type 3. Thèse de Doctorat, Université de La Réunion, Saint-Denis de La Réunion, France, 258 pp.

- Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Noël, L.D., Vital, K., Poussier, S., Hajri, A., Boureau, T., Pruvost, O., Arlat, M., Gagnevin, L., 2013. Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. Mol. Plant Pathol. doi : 10.1111/mpp.12019
- Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Hofle, M.G., Guzman, C.A, 2004. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. Appl. and Environ. Microbiol. 70, 3618-23.
- Galán, J.E., 2009. Common themes in the design and function of bacterial effectors. Cell Host Microbe. 5, 571-579.
- Genin, S., Boucher, C., 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol., 42, 107-134.
- Golmohammadi, M., Llop, P., Scuderi, G., Gell, I., Graham, J.H., Cubero, J., 2012. mRNA from selected genes is useful for specific detection and quantification of viable *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Plant Pathol. 61, 479-488.
- Golmohammadi, M., Cubero, J., López, M.M., Llop, P., 2013. The Viable but Non-culturable State in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a reversible state induced by low nutrient availability and copper stress conditions. Journal of Life Sciences., 7, 1019-1029.
- Gordo, I., Perfeito, L., Sousa, A., 2011. Fitness effects of mutations in bacteria. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 21, 20-35.
- Gordon, J.L., Escalon, A., Lefeuvre, P., Gagnevin, L., Pruvost, O. Intraspecific comparative genomics of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* reveals pathotype-specific differences and evolution, *in prep.*
- Goto, M., 1992. Citrus canker, in: Kumar, J., Chaube, H.S., Sing, U.S., Mukhopadhyay, A.N. (Eds.), Plant diseases of international importance. Diseases of fruit crops. Prentice Hall, Englewood Cliffs, pp. 170-208.

- Gottig, N., Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., Ottado, J., 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. PLoS One. 4. doi:10.1371/journal.pone.0004358
- Gottwald, T.R., Hughes, G., Graham, J.H., Sun, X., Riley, T., 2001. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. Phytopathology. 91, 30-34.
- Gottwald, T.R., Graham, J.H., Schubert, T.S., 2002. Citrus Canker: the pathogen and its impact. Plant Health Progr. 10. doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV
- Gottwald, T.R., Irey, M., 2007. Post-hurricane analysis of citrus canker. II. Predictive model estimation of disease spread and area potentially impacted by various eradication protocols following catastrophic weather events. *Plant Health Progress*.
[URL] <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/CitrusCankerII.aspx>
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Riley, T.D., Achor, D., 1992. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. Phytopathology. 82, 1319-1325.
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J., Achor, D.S., 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. Mol. Plant Pathol. 5, 1-15.
- Hasse, C.H., 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. J. Agric. Res., 4, 97-99.
- Hayward, A.C., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29, 65-87.
- Hu, Y., Zhang, J., Jia, H., Sosso, D., Li, T., Frommer, W.B., Yang, B., White, F.F., Wang, N., Jones, J.B., 2014. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. doi: 10.1073/pnas.1313271111
- Hulme, P.E., 2009. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. J. Appl. Ecol. 46, 10-18.

- Irey, M., Gottwald, T.R., Graham, J.H., Riley, T.D., Carlton, G., 2006. Post-hurricane analysis of citrus canker spread and progress towards the development of a predictive model to estimate disease spread due to catastrophic weather events. *Plant Health Progr.* 10. doi:10.1094/PHP-2006-0822-01-RS
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature.* 444, 323-329.
- Josephson, K. L., Gerba, C. P., Pepper, I. L., 1993. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3513–3515.
- Keer, J.T., Birch, L., 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods.* 53, 175–83.
- Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology.* 44, 693-695.
- Koizumi, M., Kuhara, S., 1980. Evaluation of citrus plants for resistance to bacterial canker disease in relation to the lesion extension. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. D Jpn.* 55, 73-92.
- Laia, M.L., Moreira, L.M., Dezajacomo, J., Brigati, J.B., Ferreira, C.B., Ferro, M.I.T., Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Oliveira, J.C.F., 2009. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. *BMC Microbiol.* 9. doi:10.1186/1471-2180-9-12
- Leach, J.E., Vera Cruz, C.M., Bai, J., Leung, H., 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 187-224.
- Lenski, R.E., 1997. The cost of antibiotic resistance-from the perspective of a bacterium, in: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds), *Ciba Foundation Symposium 207 - Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread.* Johns & Wiley, Chichester, pp. 131-151.
- Levin, B.R., 1981. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *Escherichia coli* populations. *Genetics.* 99, 1-23.

- Lindgren, P.B., 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35,129-152
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M., De la Cruz, F., 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* 45, 1-8.
- Lu, H., Patil, P., Van Sluys, M.A., White, F.F., Ryan, R.P., Dow, J.M., Rabinowicz, P., Salzberg, S.L., Leach, J.E., Sonti, R., Brendel, V., Bogdanove, A.J., 2008. Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One*. 3. doi: 10.1371/journal.pone.0003828
- Maiden, M.C.J., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 561-588.
- Manners, J.G., 1993. *Principles of Plant Pathology*, second ed. Press Syndicate of the University of Cambridge, New York.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614-629.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., Bonas, U., 2002. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 637-646.
- Matsuda, K., Tsuji, H., Asahara, T., Kado, Y., Nomoto K., 2006. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 32–39
- McDonald, B.A., Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 349-379.
- Mhedbi-Hajri, N., Darrasse, A., Pigné, S., Durand, K., Fouteau, S., Barbe, V., Manceau, C., Lemaire, C., Jacques, M.A., 2011. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evol. Biol.* 11. doi:10.1186/1471-2148-11-67

- Miller, R.V., 2001. Environmental bacteriophage-host interactions: factors contribution to natural transduction. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 79, 141-147.
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., Hunter, N., 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*.148(1), 257–266.
- Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., Gojobori, T., 2004. Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genet*. 36, 760-766.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U., 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol*. 184, 1340-1348.
- Ollitrault, P., Navarro, L., 2012. Citrus, in: Badenes, M.L., Byrne, D.H. (Eds.), *Fruit Breeding - Handbook of Plant Breeding*. Springer Publishing Company, New-York, pp. 623-662.
- Orr, H. A., 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat. Rev. Genet*. 10, 531-539.
- Pitkänen, T., Ryu, H., Elk, M., Hokajärvi, A.-M., Siponen, S., Vepsäläinen, A., Räsänen P., Santo Domingo J. W., 2013. Detection of Fecal Bacteria and Source Tracking Identifiers in Environmental Waters Using rRNA-Based RT-qPCR and rDNA-Based qPCR Assays. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 13611-13620.
- Poitras, E., Houde, A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotechnol*. 2, 2-11.
- Ponciano, G., Ishihara, H., Tsuyumu, S., Leach, J., 2003. Bacterial effectors in plant disease and defense: keys to durable resistance? *Plant Disease*, 87, 1272-1282.
- Poulsen, L. K., Ballard, G., Stahl, D. A., 1993. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1354–1360.
- Pourcel, C., Vergnaud, G., 2011. Strain typing using Multiple “Variable Number of Tandem Repeat”

Analysis and genetic element CRISPR, in: Persing, D.H., Tenover, F.C., Tang, Y.W., Nolte, F.S., Hayden, R.T., Van Belkum, A. (Eds.), Molecular microbiology: Diagnostic principles and practice. American Society for Microbiology Press, Washington D.C., pp. 179-197.

Pruvost, O., Hartung, J.S., Civerolo, E.L., Dubois, C., Perrier, X., 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. Phytopathology. 82, 485-490.

Pruvost, O., Magne, M., Vital, K., Leduc, A., Tourterel, C., Drevet, C., Ravigné, V., Gagnevin, L., Guérin, F., Koebnik, R., Verdier, V., Vernière, C., 2014. A MLVA genotyping scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage. PLoS ONE, 9. doi:10.1371/journal.pone.0098129

Rademaker, J.L.W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., De Bruijn, F.J., 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 665-677.

Rasmussen R., 2001. Quantification on the Light Cycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications. Heidelberg: Springer Press, 21–34.

Rigano, L.A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendin, L., Filippone, P., Torres, P.S., Questa, J., Dow, J.M., Castagnaro, A.P., Vojnov, A.A., Marano, M.R., 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Mol. Plant-Microbe Interact. 20, 1222-1230.

Rossetti V., 1977. Citrus Canker in Latin America: a review, 918–924.

Rybak, M., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Jones, J.B., 2009. Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. Mol. Plant Pathol. 10, 249-262.

Saddler, G.S., Bradbury, J.F., 2005. Family I. *Xanthomonadaceae* fam. nov., in: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M., Bonne, D.R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer Publishing Company, New-York, pp. 63-122.

- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K., Vidaver, A.K., 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 690-695.
- Scuderi, G., Golmohammadi, M., Cubero, J., Lopez, M.M., Cirvilleri, G., Llop, P., 2010. Development of a simplified NASBA protocol for detecting viable cells of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under different treatments. *Plant Pathology*, 59, 764–72.
- Seitz, P., Blokesch, M., 2012. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 336-363.
- Sheridan, G.E.C., Masters, C.I., Shallcross, J.A., Mackey, B.M., 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1313-1318.
- Skaria, M., Da Graca, J.V., 2012. History lessons towards proactive citrus canker efforts in Texas. *Subtropical Plant. Science*, 64, 29-33.
- Spratt, B.G., Maiden, M.C.J., 1999. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philos. Trans. R. Soc. London [Biol.]*. 354, 701-710.
- Stall, R.E., Seymour, C.P., 1983. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. *Plant Dis.* 67, 581-585.
- Stukenbrock, E.H., McDonald, B.A., 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 75-100.
- Swarup, S., De Feyter, R., Bransky, R.H., Gabriel, D.W., 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars or *X. campestris* to elicit canker like lesions on Citrus. *Phytopathology*. 81, 802-809.
- Swings, J.G., Civerolo, E.L., 1993. *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London.

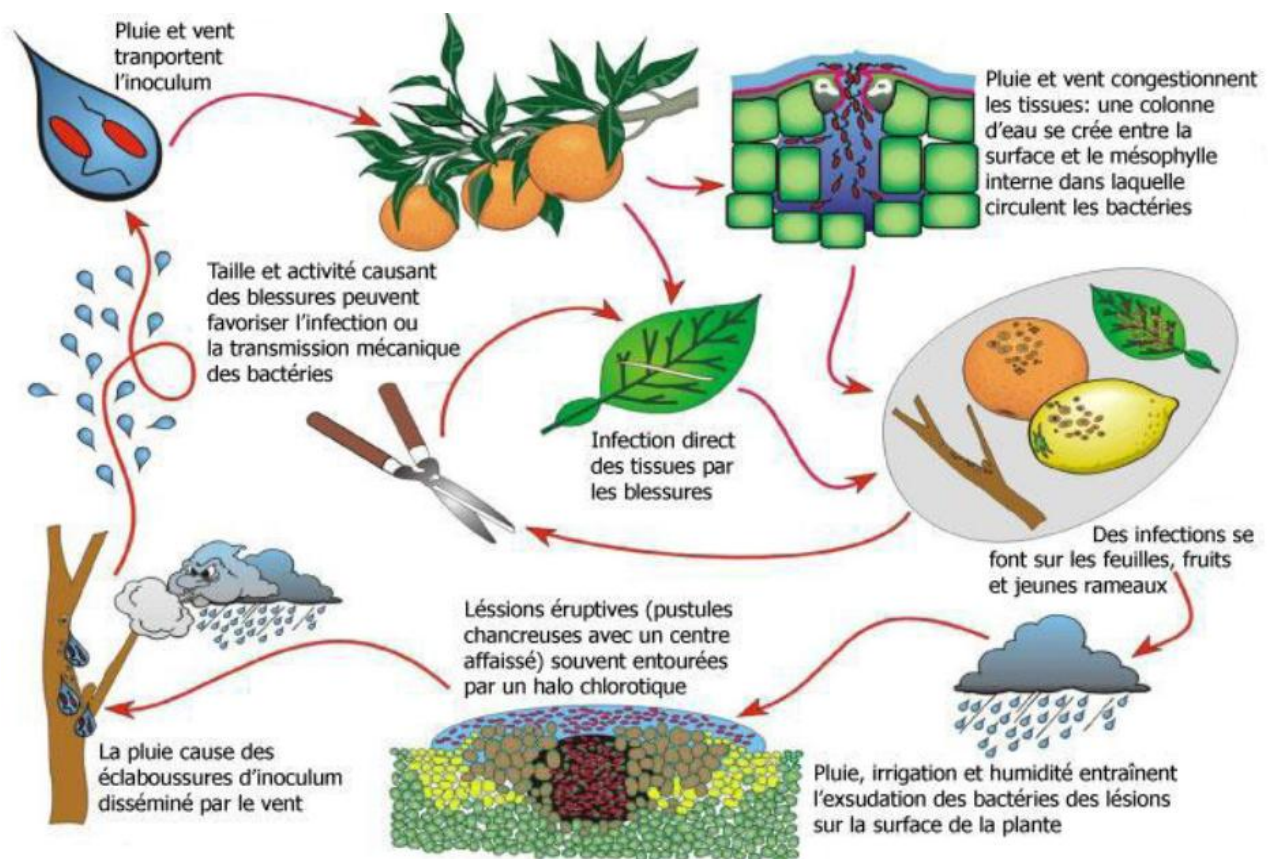
- Tampakaki, A.P., Fadouloulou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J., Kokkinidis, M., 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.* 6, 805-816.
- Tan, C.H., Koh, K.S., Xie, C., Tay, M., Zhou, Y., Williams, R., Ng, W.J., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2014. The role of quorum sensing signaling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2013.240, *in press*.
- Traoré, Y.N., Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Pruvost, O., 2008. First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri* causing citrus canker in Mali. *Plant Disease*, 92, 977.
- Tripathi, L., Mwangi, M., Abele, S., Aritua, V., Tushemereirwe, W.K., Bandyopadhyay, R., 2009. *Xanthomonas* wilt: a threat to banana production in East and Central Africa. *Plant Dis.* 93, 440-451.
- Van Elsas, J.D., Turner, S., Bailey, M.J., 2003. Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytol.* 157, 525-537.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J., 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 472-489.
- Vernière, C., Devaux, M., Pruvost, O., Couteau, A., Luisetti, J., 1991. Studies on the biochemical and physiological variations among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Fruits*. 46, 162-170.
- Vernière, C., Bui Thi Ngoc, L., Jarne, P., Ravigné, V., Guérin, F., Gagnevin, L., Le Mai, N., Chau, N.M., Pruvost, O., 2014. Highly polymorphic markers reveal the establishment of an invasive lineage of the citrus bacterial pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* in its area of origin. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.12369, *in press*.
- Ward, H.M., 1902. On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss.). *Ann. Bot.* 16, 233-315.
- Wasukira, A., Tayebwa, J., Thwaites, R., Paszkiewicz, K., Aritua, V., Kubiriba, J., Smith, J., Grant, M., Studholme, D.J., 2012. Genome-wide sequencing reveals two major sub-lineages in the genetically monomorphic pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *musacearum*. *Genes*. 3, 361-377.

- Wengelnik, K., Marie, C., Russel, M., Bonas, U., 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. J. Bacteriol. 178, 1061-1069.
- White, F.F., Potnis, N., Jones, J.B., Koebnik, R., 2009. The type III effectors of *Xanthomonas*. Mol. Plant Pathol. 10, 749-766.
- White, F.F., Yang, B., 2009. Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. Plant Physiol. 150, 1677-1686.
- Wiser, M.J., Ribeck, N., Lenski, R.E., 2013. Long-term dynamics of adaptation in asexual populations. Science. 342, 1364-1367.
- Young, J.M., Takikawa, Y., Gardan, L., Stead, D.E., 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 30, 67-105.
- Young, J.M., Allen, C., Coutinho, T., Denny, T., Elphinstone, J., Fegan, M., Gillings, M., Gottwald, T.R., Graham, J.H., Iacobellis, N.S., Janse, J.D., Jacques, M.A., Lopez, M.M., Morris, C.E., Parkinson, N., Prior, P., Pruvost, O., Neto, J.R., Scortichini, M., Takikawa, Y., Upper, C.D., 2008. Plant pathogenic bacteria as biological weapons: real threats? Phytopathology. 98, 1060-1065.
- Zaharik, M.L., Gruenheid, S., Perrin, A.J., Finlay, B.B., 2002. Delivery of dangerous goods: type III secretion in enteric pathogens. Int. J. Med. Microbiol. 291, 593-603.

ANNEXES



Annexe 1. Colonies caractéristiques de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) sur milieu de culture riche (LPGA) (étalement en « trois secteurs ») (Photos : C. Vernière, 2014).



Annexe 2. Cycle infectieux de *Xanthomonas citri* pv. *citri* (D'après Gottwald, Graham & Schubert 2002).

Annexe 3. Composition des milieux de mise en culture et des solutions tampons :

Annexe 3a. Composition du bouillon nutritif (pour 1 litre de bouillon).

Ingrédients	Dose
« 64065 » (BIO RAD) Nutrient broth	13 g
Eau osmosée	1 L

Annexe 3b. Composition du milieu LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) (pour 1 litre).

Ingrédients	Dose
Levure	7 g
Peptone	7 g
Glucose	7 g
Agar	18 g
NaOH, N	4 mL
Eau osmosée	1 L
<i>Ajustement du pH à 7,2</i>	
<i>Autoclavage (à 120°C pendant 20 minutes)</i>	

Annexe 3c. Composition du milieu LPG (Levure Peptone Glucose) (pour 1 litre).

Ingrédients	Dose
Levure	7 g
Peptone	7 g
Glucose	7 g
Eau osmosée	1 L
<i>Ajustement du pH à 7,2</i>	
<i>Autoclavage (à 120°C pendant 20 minutes)</i>	
<i>Filtration</i>	

Annexe 3d. Composition du milieu XVM2 (pour 1 litre).

Ingrédients	Dose
20 mM NaCl	1,17 g
10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	1,32 g
5 mM MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,23 g
1mM CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,147 g

0,16 mM KH ₂ PO ₄	0,0218 g
0,32 mM K ₂ HPO ₄	0,0555 g
0,01 mM FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,0278g
Eau osmosée	1 L
<i>Ajustement du pH à 7,2</i>	
<i>Autoclavage (à 120°C pendant 20 minutes)</i>	
10 mM Saccharose (= sucrose)	8,55 g
0,03% Casamino-acide (pH = 6,7)	1,5 g
<i>Ajustement du pH à 7,2</i>	
<i>Filtration</i>	

Annexe 3e. Composition du milieu KC-LPGA (Kasugamicine Cephalaxine Levure Peptone Glucose Agar) (pour 1 litre).

Ingrédients	Dose
Levure	7 g
Peptone	7 g
Glucose	7 g
Agar	18 g
NaOH, N	3 mL
Eau osmosée	1 L
<i>Ajustement du pH à 7,2</i>	
<i>Autoclavage (à 120°C pendant 20 minutes)</i>	
Tilt (propiconazole)	40 µL/4,5 mL d'eau stérile
Kasugamicine	0,02 g
Cephalaxine	0,04 g
<i>Ajustement du pH à 7,2</i>	
<i>Filtration</i>	

Annexe 3f. Composition du tampon Tris-HCl EDTA (Trizma-Hydrochloride Acide Ethylène Diamine Tétracétique) (pour 1 litre).

Ingrédients	Dose
10 mM Tris-HCl	1,576 g
0,1 mM EDTA	0,037g
Eau osmosée	1 L
<i>Ajustement du pH à 7,4</i>	
<i>Autoclavage (à 120°C pendant 20 minutes)</i>	



Annexe 4. Dénombrement manuel des colonies de *Xcc* à l'aide d'une grille de comptage Spiral standard placée sous la boîteensemencée (A. Damour, 2014).

Annexe 5. Procédure de coloration de Gram

Réalisation du frottis :

- 1) Centrifuger les échantillons à 10000 g pendant 5 minutes, et éliminer le surnageant par pipetage.
- 2) Etaler 10 μ L de l'échantillon à l'aide d'une anse de 10 μ L avec une goutte d'eau distillée, ou directement 10 μ L de la préparation si elle est liquide à l'aide d'une pipette, sur une lame.
- 3) Fixer la préparation à la chaleur en la tenant au dessus d'une flamme à l'aide d'un bec bunzen.
- 4) Sécher soigneusement la lame, puis la laisser refroidir à température ambiante.

Réalisation de la coloration de Gram :

- 1) Coloration : Immerger la lame dans une solution de cristal violet ou de violet de gentiane. Laisser agir pendant 1 minute, puis rincer à l'eau froide.
- 2) Mordantage : Immerger la lame dans une solution de lugol (solution d'iode iodo-iodurée). Laisser agir pendant 1 minute (le même temps que pour le cristal violet), puis rincer à l'eau distillée.

- 3) Décoloration (étape la plus importante) : Verser goutte à goutte de l'éthanol (70°) sur la lame inclinée obliquement jusqu'à disparition de la couleur violette. Surveiller la décoloration qui doit être rapide (environ 10 secondes). Rincer abondamment à l'eau distillée pour stopper la décoloration.
- 4) Recoloration : Immerger la lame dans une solution de safranine ou de fuchsine. Laisser agir pendant 20 à 30 secondes, puis rincer à l'eau distillée.
- 5) Séchage : Sécher soigneusement la lame à l'air libre (à température ambiante).
- 6) Observation : Observer à l'objectif x100, à l'immersion avec une goutte d'huile (grossissement x1000), à l'aide d'un microscope optique avec un éclairage important (diaphragme ouvert).

Annexe 6. Procédure d'extraction d'ARN bactérien par le kit « RNeasy® Mini kit » (Qiagen) sur culture solide.

Ce protocole est dérivé de la notice Qiagen : « RNeasy® Mini kit, Part 1 ». Il est précédé d'étapes préliminaires extraites de la publication de Golmohammadi et al., 2012, et suivi d'étapes supplémentaires dérivées de la notice « Turbo® DNase kit » (Ambion).

Etapes préliminaires (Golmohammadi et al., 2012) :

- ➔ Centrifuger l'échantillon à 5000 g pendant 5 minutes et éliminer le surnageant par pipetage.
- ➔ (Re)Suspendre le culot dans 100 µL de tampon Tris-HCl EDTA (**Annexe 3f**).
- ➔ Ajouter 2 µL de lysozyme à 20 mg/mL.
- ➔ Incuber pendant 5 minutes à température ambiante.

- 1) Ajouter 600 µL de tampon RLT (ajouter au préalable 10 µL de β-mercaptoéthanol pour 1 mL de volume RLT).
- 2) Ajouter un volume d'éthanol (70%) équivalent aux volumes ajoutés aux étapes précédentes, et bien mélanger en pipetant (« up and down »). Ne pas centrifuger.
- 3) Transférer, au maximum et en faisant des « up and down », 700 µL de l'échantillon sur une colonne d'élution (RNeasy Mini) placée sur un tube de 2 mL (fourni dans le kit). Centrifuger à 8000 g pendant 15 secondes. Jeter le surnageant et séparer la colonne du tube.
- 4) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL (fourni dans le kit) et ajouter 700 µL de tampon RW1. Centrifuger à 8000 g pendant 15 secondes. Jeter le surnageant et séparer la colonne du tube.
- 5) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL (fourni dans le kit) et ajouter 500 µL de tampon RPE. Centrifuger à 8000 g pendant 15 secondes. Jeter le surnageant.

- 6) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL (fourni dans le kit) et ajouter 500 µL de tampon RPE. Centrifuger à 8000 g pendant 2 minutes. Jeter le surnageant.

Optionnel : Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL (fourni dans le kit) et centrifuger à vitesse maximale (20000 g) pendant 1 minute afin d'assécher la membrane. Séparer la colonne du tube.

- 7) Placer la colonne sur un tube de 1,5 mL (fourni dans le kit) et ajouter 30-50 µL de RNase free water directement sur la membrane de la colonne. Centrifuger à 8000 g pendant 1 minute afin de bien éluer l'ARN. Séparer la colonne du tube.
- 8) Si la quantité d'ARN attendue est supérieure à 30 µg, répéter l'étape 7 en ajoutant encore 30-50 µL de RNase free water, ou en utilisant l'éluat provenant de l'étape 7 (si une concentration élevée d'ARN est demandée). Réutiliser le tube fourni de l'étape 7.

Etapes supplémentaires pour éliminer toute trace d'ADN (« Turbo® DNase kit » (Ambion)) :

- ➔ Ajouter 5 µL de tampon 10X Turbo DNase et bien mélanger en faisant des « up and down ».
- ➔ Ajouter 1 µL de Turbo DNase et bien mélanger en faisant des « up and down ». Centrifuger brièvement.
- ➔ Incuber 1 heure à 37°C au bain sec.
- ➔ Centrifuger brièvement et ajouter 5 µL de solution d'inactivation.
- ➔ Incuber 2 minutes à température ambiante en mélangeant régulièrement.
- ➔ Centrifuger à 10000 g pendant 10 minutes.
- ➔ Placer le surnageant (environ 50-60 µL) dans un nouveau tube de 1,5 ou 2 mL (non fourni) en faisant attention de ne pas pipeter le culot blanchâtre de la solution d'inactivation.

NB : Faire des aliquots dans plusieurs tubes de 1,5 ou 2 mL pour éviter les décongélations / recongélations à répétition, et pour ainsi éviter les contaminations.

Ces ARN extraits sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Annexe 7. (A) Composition du milieu réactionnel pour un échantillon et (B) programme de qRTPCR

⇒ Etape de la RT (Promega)

(A)

(B)

Composition	Volume (µL)
Amorce (R) (10µM)	0,40
Amorce (F) (10µM)	0,40
Eau (Nuclease free water)	6,70
Tampon GoScript 5X Reaction	4,00
MgCl ₂ (25 mM)	4,00
dNTP (0,50 mM)	1
GoScript Reverse Transcriptase	0,50
Total	17,00

Programme RT :

<i>Dénaturation</i>	25°C	5 minutes
<i>Elongation</i>	42°C	1h30
<i>Inactivation</i>	70°C	15 minutes
<i>Conservation</i>	4°C	∞

⇒ Etape de la qPCR (Taqman)

(A)

(B)

Composition	Volume (µL)
Mastermix 2X	10,00
Amorce (R) (10µM)	3,20
Amorce (F) (10µM)	3,20
Sonde (10µM)*	0,15
Eau ultra pure (HPLC)	1,45
Total	18,00

Programme qPCR (Standard) :

	50°C	2 minutes
<i>Dénaturation initiale</i>	95°C	10 minutes
<i>Dénaturation</i>	95°C	15 secondes
<i>Elongation</i>	60°C	1 minute

40 cycles

* sonde Taqman marquée en 5' par 6-FAM et en 3' par MGB

Annexe 8. (A) Composition du milieu réactionnel pour un échantillon et (B) programme de RTPCR (Platinum)

(A)		(B)		
Composition	Volume (µL)	Programme RTPCR		
Tampon 2X	12,50	<i>Dénaturation initiale</i>	48°C	30 minutes
Amorce (R) (10µM)	0,50		94°C	2 minutes
Amorce (F) (10µM)	0,50	<i>Dénaturation</i>	94°C	15 secondes
RT Platinum Taq	0,50	<i>Hybridation</i>	60°C	30 secondes
Eau (RNase free water)	9,00	<i>Elongation</i>	72°C	30 secondes
		<i>Elongation finale</i>	72°C	10 minutes
Total	23,00	<i>Conservation</i>	12°C	∞

Annexe 9. Procédure d'extraction d'ADN bactérien par le kit « DNeasy® Blood & Tissue » (Qiagen) sur culture solide.

Ce protocole est dérivé de la notice Qiagen : « Appendix D - Extraction of gram negative bacteria & Purification of total DNA (step 2 p.19) ».

Etapes antérieures :

- ➔ Centrifuger à 5000 g pendant 10 minutes et éliminer le surnageant par pipetage.
- ➔ Resuspendre le culot dans 180 µL de tampon ATL.

- 1) Ajouter 20 µL de protéinase K, bien vortexer et incubé 3h à 56°C au bain-marie ou au thermomixer avec des agitations occasionnelles (toutes les 15 minutes à environ 750-800 g) ou à 600 g en agitation constante.

Variante : incubé une nuit à température ambiante.

La lyse est complète au bout d'une à trois heures en fonction des échantillons. Certains échantillons peuvent être incubés pendant une nuit. Après incubation, la lyse doit être matérialisée par un aspect visqueux mais non gélatineux car cela obstruerait la colonne.

- 2) Ajouter 4 µL de RNase A (à 100 mg/mL), bien vortexer et incubé 2 minutes à température ambiante.

- 3) Vortexer 15 secondes et ajouter 200 µL de tampon AL. Bien vortexer immédiatement.

Un précipité blanc peut apparaître après addition du tampon. Ce précipité disparaîtra au cours de

l'incubation. Le produit de lyse peut être gélatineux. Dans ce cas, agiter vigoureusement ou vortexer jusqu'à disparition.

- 4) Ajouter 200 µL d'éthanol (96-100%) et bien vortexer immédiatement.

Il est important d'agiter vigoureusement afin d'obtenir une solution homogène. Dans le cas où un précipité blanc se forme, il faut absolument le transférer sur la colonne d'élution.

Optionnel : Mélanger à l'avance le tampon AL et l'éthanol (50/50) et ajouter 400 µL du mélange.

- 5) Pipeter le mélange obtenu et le déposer sur la colonne d'élution (DNeasy Mini) placée sur un tube de 2 mL (fourni dans le kit). Centrifuger à 6000 g pendant 1 minute. Jeter le surnageant et séparer la colonne du tube.
- 6) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL (fourni dans le kit) et ajouter 500 µL de tampon AW1. Centrifuger à 6000 g pendant 1 minute. Jeter le surnageant et séparer la colonne du tube.
- 7) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL (fourni dans le kit) et ajouter 500 µL de tampon AW2. Centrifuger à 20000 g pendant 3 minutes (vitesse maximale) afin d'assécher la membrane. Jeter le surnageant et séparer la colonne du tube.

La centrifugation permet d'éliminer les dernières traces d'éthanol. Si des traces d'éthanol sont observées dans le tube, changer de tube et centrifuger de nouveau à 20.000g pendant 1 min.

- 8) Placer la colonne sur un tube de 2 mL (non fourni dans le kit) et ajouter 100 µL de tampon AE (permet l'élution) directement sur la membrane de la colonne. Incuber 1 minute à température ambiante. Centrifuger à 6000 g pendant 1 minute.
- 9) Renouveler l'élution une fois sur un nouveau tube, puis transférer le contenu dans le premier tube. NB : Avec un tube de 2mL à fond ovale, les deux éluions peuvent se faire dans le même tube.

Ces ADN extraits sont ensuite conservés à -30°C jusqu'à utilisation.

Annexe 10. (A) Composition du milieu réactionnel pour un échantillon et (B) programme de qPCR

(A)		(B)	
Composition	Volume (µL)	Programme qPCR (Standard) :	
Mastermix 2X	10,00	50°C 2 minutes	
Amorce (R) (10µM)	3,20	<i>Dénaturation initiale</i>	95°C 10 minutes
Amorce (F) (10µM)	3,20	<i>Dénaturation</i>	95°C 15 secondes
Sonde (10µM)*	0,15	<i>Elongation</i>	60°C 1 minute
Eau ultra pure (HPLC)	1,45	40 cycles	
Total	18,00		

Annexe 11. (A) Composition du milieu réactionnel pour un échantillon et (B) programme de qRT-PCR (Taqman)

(A)		(B)	
Composition	Volume (µL)	Programme qRT-PCR :	
Mastermix 4X	2,50	50°C 5 minutes	
Amorce (R) (10µM)	0,65	<i>Dénaturation initiale</i>	95°C 20 secondes
Amorce (F) (10µM)	0,65	<i>Dénaturation</i>	95°C 3 secondes
Sonde (10µM)*	0,175	<i>Elongation</i>	60°C 30 secondes
RT-PCR Grade water	5,025	40 cycles	
Total	9,00		

Annexe 12. (A) Composition du milieu réactionnel pour un échantillon et (B) programme de qPCR (Taqman)

(A)		(B)		
Composition	Volume (µL)	Programme qPCR (Standard) :		
Mastermix 2X	5,00	50°C 2 minutes		
Amorce (R) (10µM)	1,60	<i>Dénaturation initiale</i> 95°C 10 minutes		
Amorce (F) (10µM)	1,60	<i>Dénaturation</i> 95°C 15 secondes		
Sonde (10µM)*	0,075	<i>Elongation</i> 60°C 1 minute		
Eau ultra pure (HPLC)	0,725	40 cycles		
Total	9,00			

Annexe 13. Procédure d'extraction d'ADN bactérien par le kit « DNeasy® Plant Mini kit » (Qiagen) sur du matériel végétal.

- 1) Récupérer un maximum de 100 mg de matériel végétal.
- 2) Ajouter 400 µL de tampon AP1 et 4 µL de RNase A (à 100 mg/mL), et vortexer vigoureusement.
- 3) Incuber 10 minutes à 65°C. Pendant l'incubation, mélanger 2 à 3 fois en renversant le tube.
- 4) Ajouter 130 µL de tampon P3, vortexer et incuber 5 minutes dans de la glace.

Optionnel : Centrifuger à la vitesse maximale (20000 g) pendant 5 minutes.

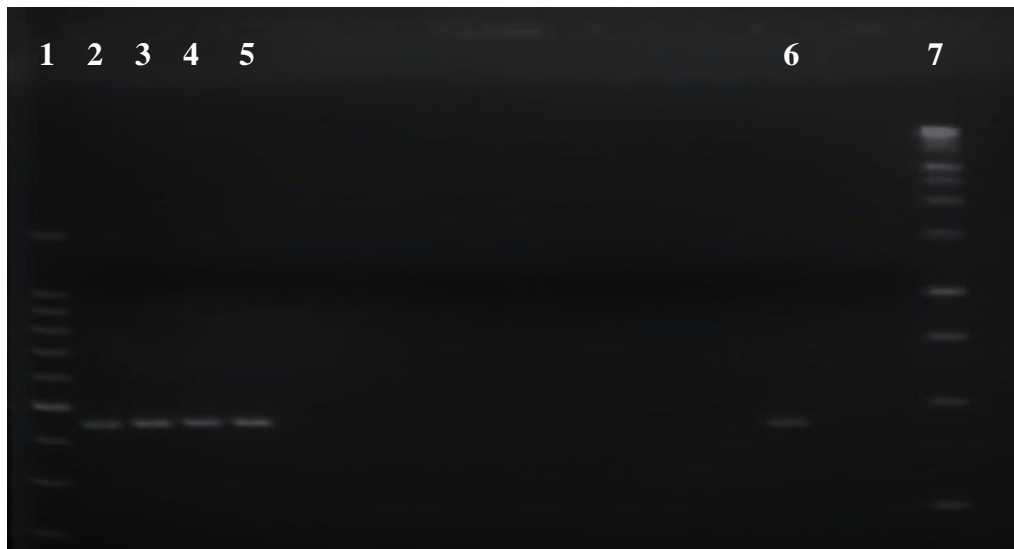
- 5) Pipeter et déposer le mélange obtenu (lysate) sur une colonne d'éluion (QIAshredder) placée sur un tube de 2 mL (fourni dans le kit). Centrifuger à la vitesse maximale (20000 g) pendant 2 minutes.
- 6) Transférer le surnageant sur un nouveau tube de 2 mL (non fourni dans le kit) sans prendre le culot.
- 7) Ajouter un volume de tampon AW1 équivalent à 1,5 fois des volumes ajoutés aux étapes précédentes (i.e. $(400+4+130) \times 1,5 = 801 \text{ µL}$), et bien mélanger en pipetant (« up and down »).
- 8) Transférer, au maximum et en faisant des « up and down », 650 µL du mélange sur une colonne d'éluion (DNeasy Mini) placée sur un tube de 2 mL (fourni dans le kit). Centrifuger à 6000 g pendant 1 minute, et jeter le surnageant.
- 9) Répéter l'étape 8 avec le mélange restant. Jeter le surnageant et séparer la colonne du tube.

- 10) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL (fourni dans le kit) et ajouter 500 μ L de tampon AW2. Centrifuger à 6000 g pendant 1 minute. Jeter le surnageant.
- 11) A nouveau, ajouter 500 μ L de tampon AW2. Centrifuger à la vitesse maximale (20.000 g) pendant 2 minutes afin d'assécher la membrane.
- 12) Placer la colonne sur un tube de 1,5 ou 2 mL (non fourni dans le kit) et ajouter 100 μ L de tampon AE (préchauffé à 65°C) directement sur la membrane de la colonne. Incuber 5 minutes à température ambiante et centrifuger à 6000 g pendant 1 minute pour bien éluer.
- 13) Renouveler l'élution une fois sur un nouveau tube, puis transférer le contenu dans le premier tube. NB : Avec un tube de 2 mL à fond ovale, les deux élutions peuvent se faire dans le même tube.

Ces ADN extraits sont ensuite conservés à -30°C jusqu'à utilisation.



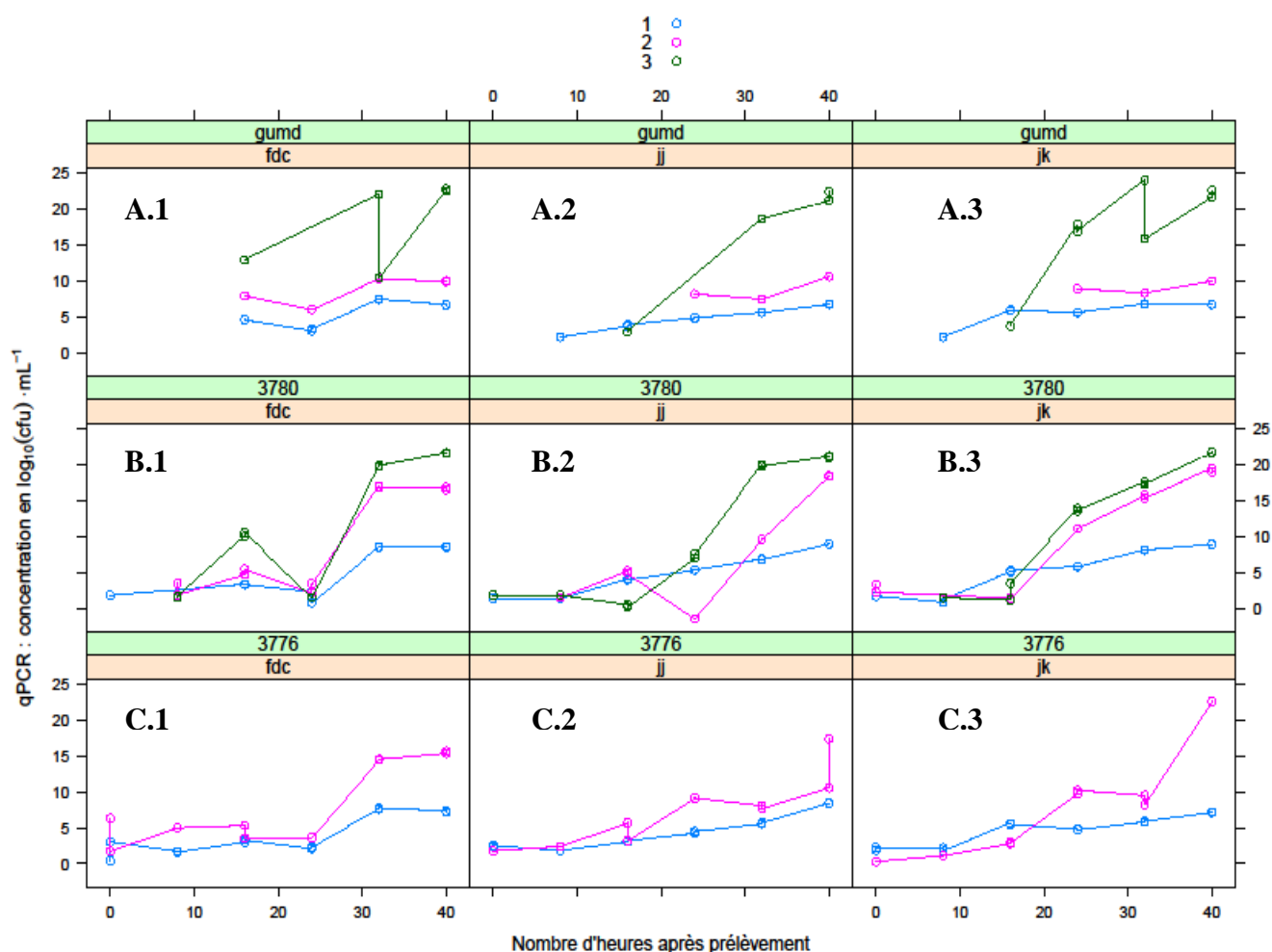
Annexe 14. Profil de gel d'électrophorèse de RTPCR Platinum (simplex) obtenu à partir d'échantillons de la souche IAPAR 306 de *Xcc*, à une concentration de 10^5 CFU.mL⁻¹, inactivés et non inactivés par la chaleur à 80°C pendant 30 minutes. Les puits 1 et 15 représentent respectivement le marqueur de poids moléculaire de 100 pb et de 1 kb. Les puits 2 et 3 représentent respectivement l'échantillon traité et l'échantillon non traité à la chaleur avec comme marqueur le couple d'amorces MG-gumD1F/ MG-gumD1R ; il en est de même pour les puits 4 à 13. Les puits 3, 5, 7, 9, 11 et 13 auraient dû montrer une bande (la taille de fragment attendu est de 445 pb) car ne sont pas traités à la chaleur ; ils s'avèrent donc négatifs. Le puits 14 représente un témoin positif (souche 6367 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*) (A. Damour, CIRAD 2014).



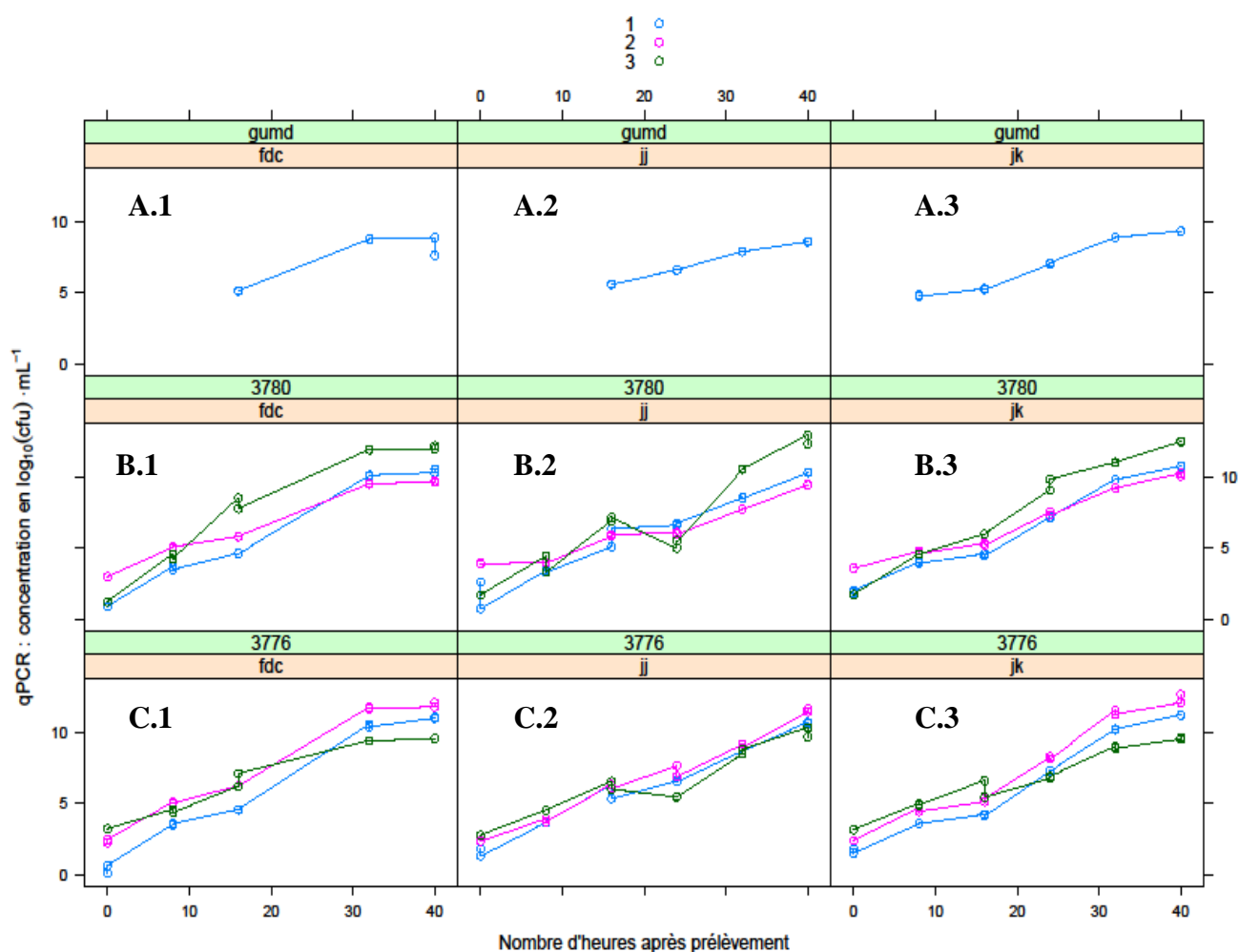
Annexe 15. Profil de gel d'électrophorèse de RTPCR Platinum (simplex) obtenu à partir d'échantillons de la souche IAPAR 306 de *Xcc*, à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹, inactivés et non inactivés par la chaleur à 80°C pendant 30 minutes. Les puits 1 et 7 représentent respectivement le marqueur de poids moléculaire de 100 pb et de 1 kb. Les puits 2 et 3 représentent respectivement l'échantillon traité et l'échantillon non traité à la chaleur avec comme marqueur le couple d'amorces MG-gumD1F/ MG-gumD1R ; il en est de même pour les puits 4 et 5. Les puits 2 et 4 n'auraient dû montrer de bande car sont traités à la chaleur. Le puits 6 représente un témoin positif (souche 6367 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*) (A. Damour, CIRAD 2014).



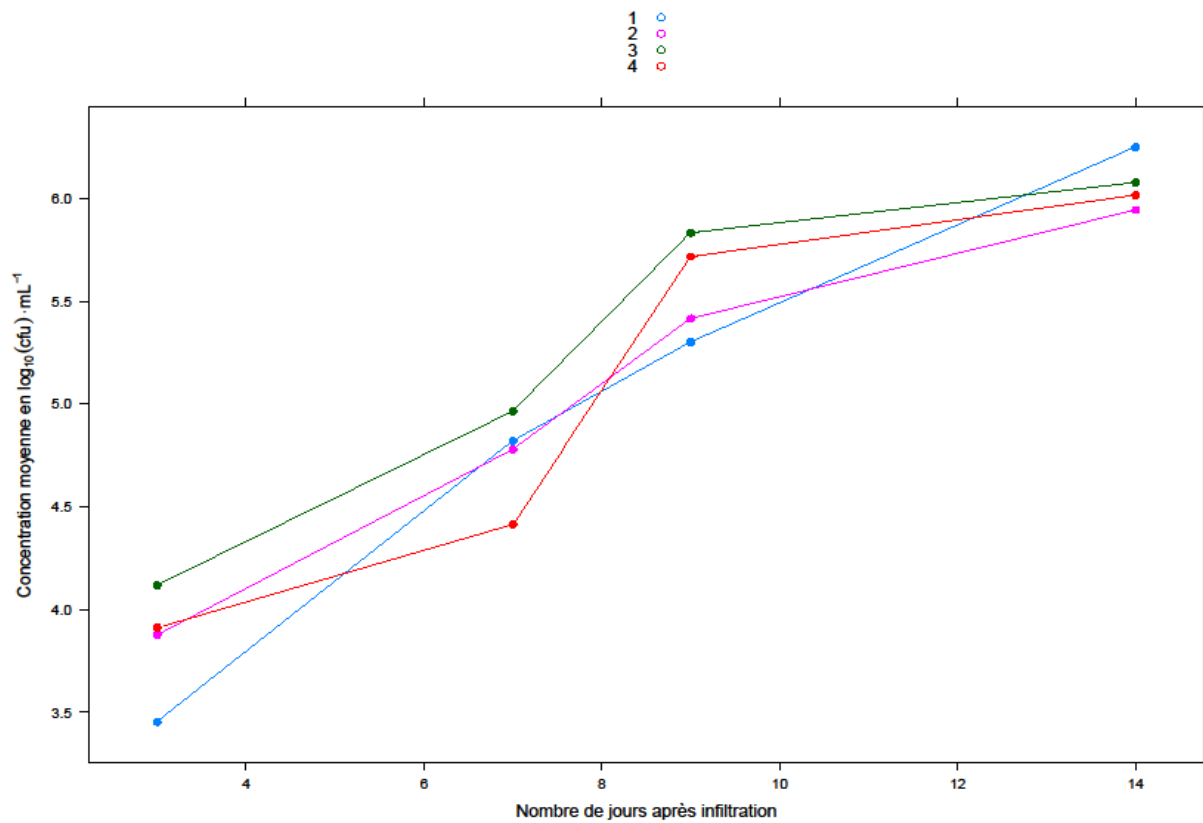
Annexe 16. Profil de gel d'électrophorèse de RTPCR Platinum (simplex) obtenu à partir d'échantillons de la souche IAPAR 306 de *Xcc*, à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹, inactivés et non inactivés par la chaleur à 80°C pendant trois heures. Les puits 1 et 10 représentent respectivement le marqueur de poids moléculaire de 100 pb et de 1 kb. Les puits 2 et 3 représentent respectivement l'échantillon traité et l'échantillon non traité à la chaleur avec comme marqueur le couple d'amorces MG-gumD1F/ MG-gumD1R ; il en est de même pour les puits 4 à 9 (A. Damour, CIRAD 2014).



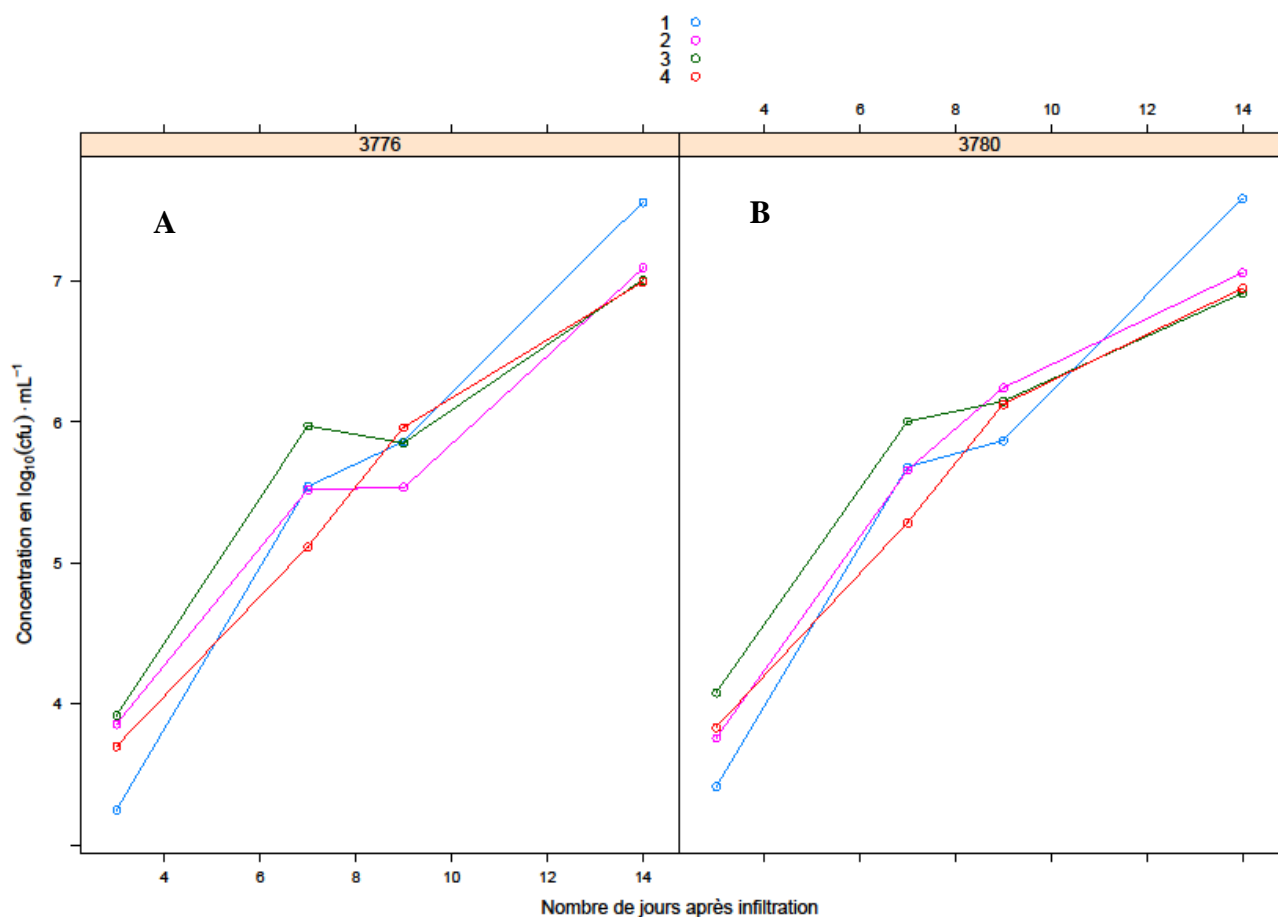
Annexe 17. Cinétiques de croissance bactérienne sur milieu minimum (XVM2) déterminée par qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) pour les trois souches bactériennes de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), IAPAR 306 (1), JJ238.17 (2) et JK4.1 (3) avec les marqueurs MG-gumD1 (A), XAC-3776 (B) et XAC-3780 (C). Les courbes bleues, roses et vertes représentent respectivement les répétitions 1, 2 et 3. La concentration bactérienne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtenue par qRT-PCR figure en ordonnées. Le nombre d'heures après le premier prélèvement figure en abscisses (prélèvement toutes les huit heures pour ce milieu).



Annexe 18. Cinétiques de croissance bactérienne sur milieu minimum (XVM2) déterminée par qPCR pour les trois souches bactériennes de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), IAPAR 306 (1), JJ238.17 (2) et JK4.1 (3) avec les trois marqueurs MG-gumD1 (A), XAC-3780 (B) et XAC-3776 (C). Les courbes bleues, roses et vertes représentent respectivement les répétitions 1, 2 et 3. La concentration bactérienne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtenue par qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) figure en ordonnées. Le nombre d'heures après le premier prélèvement figure en abscisses (prélèvement toutes les huit heures pour ce milieu).



Annexe 19. Cinétiques de croissance bactérienne *in planta* sur le limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*) déterminée par dénombrement sur milieu de culture pour la souche bactérienne de référence (IAPAR 306) de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*). Les courbes bleues, roses, vertes et rouges représentent respectivement les répétitions 1, 2, 3 et 4. La concentration bactérienne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre (CFU.mL⁻¹) obtenue par dénombrement sur milieu de culture figure en ordonnées. Le nombre de jours après infiltration sur feuilles figure en abscisses.



Annexe 20. Cinétiques de croissance bactérienne *in planta* sur le limettier mexicain (*Citrus aurantiifolia*) déterminée par qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) pour la souche bactérienne de référence (IAPAR 306) de *Xcc* (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), avec les marqueurs XAC-3776 (A) et XAC-3780 (B). Les courbes bleues, roses, vertes et rouges représentent respectivement les répétitions 1, 2, 3 et 4. La concentration bactérienne en logarithme d'unité formant colonie par millilitre ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtenue par qPCR figure en ordonnées. Le nombre de jours après infiltration sur feuilles figure en abscisses.

Résumé

Le chancre asiatique des agrumes causé par *Xanthomonas citri* pv. *citri* est l'une des phytobactérioses majeures des cultures agrumicoles dans le monde. La mesure du fitness de souches bactériennes peut être une voie pour comprendre l'émergence de certaines souches responsables d'épidémies. Dans le but de mesurer une des composantes du fitness (i.e. la multiplication *in planta*) chez des souches invasives de *Xcc* appartenant au pathotype A, deux outils moléculaires ont été développés dans cette étude, la qPCR (ciblant l'ADN) et la qRTPCR (ciblant l'ARNm). La qRTPCR possède l'avantage de ne détecter que les bactéries viables. Des marqueurs d'ARNm sont ainsi évalués pour leur pertinence en tant que marqueurs de viabilité par des expérimentations de traitement à la chaleur en utilisant la technique de qRTPCR. Les deux techniques moléculaires ont ensuite été évaluées sur des cinétiques de croissance *in vitro* et *in planta* en parallèle avec une méthode conventionnelle de dénombrement sur milieu de culture, afin de comparer les différentes méthodes entre elles. Une absence de congruence a été constatée entre les concentrations bactériennes obtenues par la méthode de qRTPCR et celles obtenues par la méthode de dénombrement sur milieu de culture. Ces données suggèrent que la méthode de qRTPCR n'est pas appropriée pour quantifier de façon fiable les souches de *Xcc* étudiées ici. A l'inverse, une très bonne corrélation est trouvée entre les concentrations bactériennes obtenues par la méthode de qPCR et celles obtenues par la méthode de dénombrement sur milieu de culture. Cette étude montre que la meilleure alternative à la méthode microbiologique est la qPCR (plus rapide et moins fastidieuse) basée sur deux marqueurs discriminants que sont XAC-3776 et XAC-3780. L'intérêt majeur de cette méthode est la possibilité de réaliser des co-inoculations. Ainsi, les deux marqueurs trouvés ici, porteurs de mutations ponctuelles qui sont exploitables en technologie Taqman, permettront d'amplifier de façon discriminante des souches appartenant à deux sous-groupes génétiques intrapathotypes de *Xcc* (DAPC 1 et 2).

Mots-clés : *Xanthomonas citri* pv. *citri*, chancre asiatique des agrumes, fitness bactérien, PCR et RT-PCR quantitatives, viabilité bactérienne.

Abstract

Citrus Bacterial Canker caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*) is one of the most harmful plant disease of citrus cultures worldwide. Fitness measure of bacterial strains allows understanding emergence of strains implicated in epidemy. In order to quantify one of the components of fitness (i.e. *in planta* multiplication) of invasives strains of *Xcc* belonging to the A pathotype, two molecular methods were developed in this study: DNA-targeted qPCR and mRNA qRTPCR. qRTPCR allows sensitive and accurate detection of viable bacteria. mRNA markers were assessed for their relevance as viability markers by heat treatments by using qRTPCR method. Both molecular methods were assessed *in vitro* and *in planta* growth kinetic by comparison with a culture method, in order to compare these different methods between them. Miss of congruence was noted between bacterial concentration obtained by qRTPCR and by culture methods. These data show that qRTPCR was not appropriate to trustly quantify *Xcc* strains in this study. At the opposite, a significant correlation was found between bacterial concentration obtained by qPCR and those obtained by culture method. This study shows that the best alternative of culture method is qPCR (less time-consuming and less fastidious) based on two discriminated markers (XAC-3776 and XAC-3780). This technic is particularly interesting because it allows co-inoculations. The two markers found in this study (that have mismatches detectable by Taqman technology) will allow discriminative amplifications of strains belonging to the two genetic subgroups of *Xcc* (DAPC 1 and 2).

Keywords: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, citrus bacterial canker, bacterial fitness, quantitative PCR and RT-PCR, bacterial viability.